

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Mgr. Michaela Bebová

Interakce vybraných flavonoidních látek se sulfotransferasou 1A1

Interaction of flavonoid compounds with sulfotransferase 1A1

Rigorózní práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně pod vedením mého školitele prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně ocitovala. Ani tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Podpis.....

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala především svému školiteli, panu prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc., za cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval při vypracování této rigorózní práce.

Dále bych na tomto místě ráda poděkovala paní laborantce Anně Ammerové a Mgr. Zdislavě Boštíkové, které mi byly oporou a pomocí v záležitostech, týkajících se experimentálního měření. Mé poděkování také patří celému kolektivu katedry biochemie za vytvoření příjemného prostředí a vždy obětavou pomoc. Závěrem bych ráda poděkovala za podporu a trpělivost své rodině a přátelům.

Tato práce vznikla za podpory grantové agentury ČR č. P303/I2/G163.

Abstrakt

V poslední době je věnována stále větší pozornost přírodním polyfenolickým sloučeninám, obsaženým v rostlinné stravě. Velkou skupinu těchto látek představují flavonoidy, které jsou obsaženy v mnoha doplňcích stravy. Spotřeba těchto preparátů se s nově objevovanými prospěšnými účinky na zdraví stále zvyšuje. Užívání vysokých dávek přírodních, ale přesto pro tělo cizích látek, může být spojeno s nežádoucími efekty. Některé flavonoidní látky jsou modulátory enzymů I. a II. fáze biotransformace xenobiotik a jejich inhibice či indukce může zasáhnout do endogenního metabolismu.

V této rigorózní práci byly zkoumány vlivy vybraných flavonoidních sloučenin dihydromyricetinu (DHM) a myricetinu (MYR) na aktivitu a expresi enzymů II. fáze biotransformace, sulfotransferas 1A1 (SULT1A1) v játrech a střevech potkanů. SULT1A1 se významně podílí na metabolické aktivaci xenobiotik. Indukce či stimulace prostřednictvím flavonoidních sloučenin tedy může potencovat tvorbu karcinogenů a zvýšit riziko rozvoje rakoviny. Jako referenční látky byly do studie dále zahrnuty flavonoidy biochanin A (BIA) a kvercetin.

Flavonoidní látky byly podávány potkanům gaváží do žaludku za účelem studia interakcí v podmínkách *in vivo*. Flavonoid DHM zvýšil aktivitu SULT1A1 a také indukoval expresi SULT1A1 v jaterní tkáni. Podání BIA zvýšilo aktivitu SULT1A1 ve tkáni jater, distální části tenkého střeva a tlustého střeva oproti kontrole. BIA také indukoval expresi SULT1A1 v jaterní tkáni. Míra exprese SULT1A1 ve střední a distální části tenkého střeva byla u všech cytosolárních vzorků včetně kontroly srovnatelná - protein byl exprimován nezávisle na premedikaci. Z kombinovaných podání způsobilo nejvyšší nárůst aktivity SULT1A1 oproti kontrole podání flavonoidů BIA + MYR v jaterní tkáni.

Následně byl zkoumán i vliv flavonoidních sloučenin na aktivitu lidského rekombinantního enzymu SULT1A1 v podmínkách *in vitro*. Dihydromyricetin, myricetin, ani biochanin A neinhibovaly aktivitu SULT1A1. Referenční flavonoid kvercetin inhiboval aktivitu SULT1A1 a byla stanovena jeho hodnota $IC_{50} = 10,7 \mu M$, která koreluje s již publikovanými výsledky.

Klíčová slova: cytosolární sulfotransferasy, dihydromyricetin, biotransformace

Abstract

Increased attention has recently been paid to the natural polyphenolic compounds contained in food of plant origin. Flavonoids represent a large group of phytochemicals that are contained in many dietary supplements. Consumption of these products increases as new findings of beneficial effects on health are discovered. Using high doses of natural, but for the human body xenobiotic compounds may be associated with negative effects. Some flavonoids are modulators of enzymes involved in phase I and phase II biotransformation and their inhibition or induction may interfere with endogenous metabolism.

In this study, the effects of selected flavonoid compounds dihydromyricetin (DHM) and myricetin (MYR) on the activity and expression of enzymes of phase II biotransformation, sulfotransferases 1A1 (SULT1A1), in liver and intestine of rats were investigated. SULT1A1 is significantly involved in the metabolic activation of xenobiotics. Thus, induction or stimulation by flavonoid compounds may potentiate the formation of carcinogens and increase the risk of developing cancer. As reference flavonoid compounds, biochanin A (BIA) and quercetin were additionally included in the study. Flavonoid compounds were administered by gavage into the stomach of rats to study the potential interactions *in vivo*. Flavonoid DHM increased the SULT1A1 activity and also induced the expression of SULT1A1 in liver. Administration of BIA increased SULT1A1 activity in the liver tissue, distal part of small intestine and colon compared to control treatment. BIA also induced the expression of SULT1A1 in liver. The SULT1A1 expression in the middle and distal part of the small intestine was comparable in all cytosolic samples including the control – the protein was expressed independently of the applied treatment. Of the combined administration, the highest increase in SULT1A1 activity over control was observed for the administration of BIA + MYR flavonoids in liver.

Subsequently, the influence of flavonoid compounds on the activity of the human recombinant enzyme SULT1A1 *in vitro* was examined. Dihydromyricetin, myricetin or biochanin A did not inhibit the activity of SULT1A1. Reference flavonoid quercetin inhibited the activity SULT1A1 with an established value of $IC_{50} = 10.7 \mu M$, which correlates with earlier published results.

Keywords: cytosolic sulfotransferases, dihydromyricetin, biotransformation (In Czech)

Obsah

Seznam zkratk	7
1. ÚVOD	9
1.1. Chemická karcinogeneze	9
1.1.1. Karcinogenní látky v potravě	10
1.2. Biotransformace xenobiotik	11
1.2.1. První fáze biotransformace	12
1.2.2. Druhá fáze biotransformace	13
1.2.2.1. Sulfátová konjugace	13
1.3. Cytosolární sulfotransferasy	14
1.3.1. Nomenklatura a klasifikace SULT	15
1.3.2. Tkáňová distribuce SULT	17
1.3.3. Struktura SULT a mechanismus jejich katalýzy	18
1.3.4. Role SULT v karcinogenezi	19
1.3.5. Modulace aktivity a exprese SULT	21
1.3.6. Enzym SULT1A1	23
1.4. Flavonoidní látky	24
1.4.1. Metabolismus flavonoidních sloučenin	25
1.4.2. Biologické účinky flavonoidních látek	25
1.4.3. Modulace aktivity a exprese biotransformačních enzymů flavonoidy	26
1.4.4. Studované flavonoidní látky	28
1.4.4.1. Dihydromyricetin	28
1.4.4.2. Myricetin	29
1.4.4.3. Biochanin A	30
1.4.4.4. Kvercetin	30
2. CÍL PRÁCE	32
3. MATERIÁL A METODY	33
3.1. Materiál a chemikálie	33
3.2. Přístroje	35
3.3. Metody	37
3.3.1. Premedikace potkanů	37
3.3.2. Izolace cytosolárních a mikrosomálních frakcí	38
3.3.3. Stanovení koncentrace proteinů	39
3.3.4. SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	40
3.3.5. Western blot	41
3.3.6. Stanovení aktivity SULT1A1 v cytosolárních vzorcích	43
3.3.7. Inhibice aktivity SULT1A1 působením flavonoidních látek	44
4. VÝSLEDKY	45
4.1. Izolace buněčných frakcí a stanovení koncentrace proteinů	45
4.2. Stanovení aktivity SULT1A1 v cytosolárních vzorcích	47
4.3. Stanovení exprese SULT1A1 po premedikaci flavonoidními sloučeninami	51
4.4. Inhibiční účinky flavonoidních látek na aktivitu SULT1A1	54
5. DISKUZE	57
6. SOUHRN	61
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62

Seznam zkratek

AAF	acetylaminofluoren
APS	persíran amonný („ammonium persulfate“)
BaP	benzo[<i>a</i>]pyren
BIA	biochanin A
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BSA	hovězí sérový albumin („bovine serum albumin“)
Caco-2	buněčná kultura lidských, intestinálních rakovinných buněk („intestinal carcinoma cells“)
CBB	Coomassie brilliant blue R-250
CYP	cytochrom P450
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHM	dihydromyricetin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E ₁	estron
E ₂	17 β -estradiol
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GST	glutathion-S-transferasy
HAA	heterocyklické aromatické aminy
Hep G2	buněčná kultura lidských, jaterních rakovinných buněk („cultured human hepatic carcinoma cells“)
IARC	Mezinárodní Agentura pro výzkum rakoviny („International Agency for Cancer research“)
IC ₅₀	polovina maximální inhibiční koncentrace
IgG	protilátka typu G
kDa	kilodalton
KVR	kvercetin
MFO	oxidasy se smíšenou funkcí („Mixed Function Oxidase“)
mRNA	mediátorová RNA („messenger RNA“)
MYR	myricetin
NAT	<i>N</i> -acetyltransferasy

NBT	nitrotetrazolová modř
OH-PhIP	hydroxy-2-amino-1-methyl-6-fenylimidazol[4,5-b]pyridin
OH-AAF	hydroxy-2-acetylaminofluoren
PAP	3'-fosfoadenosin-5-fosfát
PAPS	3'-fosfoadenosin-5-fosfosulfát
PhIP	2-amino-1-methyl-6-fenylimidazol[4,5-b]pyridin
pNPS	<i>p</i> -nitrofenylsulfát
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPM	počet otáček za minutu („rotation per minute“)
SDS	dodecylsírán sodný
SO	slunečnicový olej
ST	membránové sulfotransferasy
SULT	cytosolární sulfotransferasy
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
UGT	UDP-glukuronosyltransferasy
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem

1. ÚVOD

1.1. Chemická karcinogeneze

Člověk je soustavně vystaven vnějšímu prostředí, které obsahuje chemické látky, schopné narušit endogenní metabolismus. Organismus má rozsáhlé reparační mechanismy, kterými může exogenní vlivy „neutralizovat“, přes to ale negativní vlivy často převáží a způsobí vážná onemocnění. Rozsáhlé epidemiologické a experimentální studie pomáhají odhalit povahu a efekt některých chemických látek, vznikajících jako produkty lidské činnosti na lidský organismus, jejichž působení je příčinou zvyšující se incidence původně neznámých onemocnění - chemické karcinogeneze¹. Karcinogeneze je komplexní proces, který je ovlivňován mnoha faktory, které se vzájemně potencují. Čím více je člověk exponován karcinogenním činitelům, tím dříve dochází k akumulaci negativních efektů k propuknutí rakovinného bujení. Onemocnění tedy nejčastěji nevzniká náhle, ale postupně v řádu let. Proces karcinogeneze lze rozdělit do 3 stupňů: iniciace, promoce a progres. Iniciační procesy probíhají na úrovni genetické informace, kdy dochází k mutacím DNA a klíčových genů buňky. Ve fázi promoce pak dochází vlivem exprese poškozených genů ke klonální expanzi a nekontrolovatelnému dělení již iniciovaných buněk. Finální stupeň progresu je charakterizován nekontrolovatelnou buněčnou proliferací, invazí buněk a tvorbou tzv. metastáz².

Chemické karcinogenní látky lze rozdělit do dvou skupin podle toho, jestli přímo zasahují genetickou informaci anebo podporují rozvoj karcinogeneze jinými procesy. První skupinu tvoří genotoxické karcinogeny, které atakují DNA a způsobují mutace nebo se přímo kovalentně váží na báze DNA za tvorby aduktů, čímž pozměňují genetickou informaci buňky. Mezi nejzávažnější poruchy patří mutace tzv. onkogenů, které kódují funkční proteiny důležité pro buněčný cyklus, apoptózu či signalizaci. Mezi genotoxické karcinogeny patří např. někteří zástupci heterocyklických aromatických aminů (HAA), arzen, aflatoxin nebo benzo[*a*]pyren³. Druhou skupinu představují epigenetické karcinogeny, které nereagují přímo s genetickým materiálem buněk, ale mohou sloužit jako tzv. kokarcinogeny, tedy látky potencující vliv karcinogenů. Příkladem těchto sloučenin mohou být i některé přírodní fenolické látky, které indukují biotransformační enzymy, zodpovědné za metabolickou aktivaci potravních prokarcinogenů (podrobněji v kap. 1.4.3.). Mezi kokarcinogeny se řadí např. pohlavní hormony estrogeny či některá potravní aditiva.

1.1.1. Karcinogenní látky v potravě

Mezi hlavní chemické faktory podílející se na incidenci nádorových onemocnění patří životní a pracovní prostředí, konzumace alkoholu, kouření tabákových výrobků a strava, jejíž podíl ze všech faktorů je odhadován až na 40 %⁴. Karcinogeny se v potravě mohou vyskytovat přirozeně, vznikat při tepelném nebo technologickém zpracování potravin anebo mohou být zavedeny kontaminací z okolí. Takové látky se sice často v potravě vyskytují v malém množství, které není akutně nebezpečné pro zdraví člověka, je však nezanedbatelným faktem, že účinky všech přijímaných karcinogenů na organismus se sčítají a důsledky působení se tedy mohou projevit až po delší době⁵.

Mezi nejzávažnější potravní karcinogeny a prokarcinogeny patří zejména heterocyklické aromatické aminy, kondenzované aromatické uhlovodíky a *N*-nitrososloučeniny⁵. Dle oficiální databáze vedené Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) jsou karcinogeny a potenciální karcinogeny děleny do čtyř skupin podle pravděpodobnosti karcinogenních účinků na člověka⁶:

Skupina 1	Látka je prokázaný karcinogen pro člověka
Skupina 2A	Látka je pravděpodobný karcinogen pro člověka
Skupina 2B	Látka je možný karcinogen pro člověka
Skupina 3	Látku nelze klasifikovat jako karcinogen pro člověka
Skupina 4	Látka pravděpodobně není karcinogenem pro člověka

V roce 2015 byla jako *pravděpodobně karcinogenní* (skupina 2A) označena i konzumace červeného masa a to hlavně na základě studií věnujících se rakovině tlustého střeva. Tepelně upravené červené maso (dle definice svalovina masa savců zahrnující hovězí, telecí, vepřové, jehněčí, skopové, koňské a kozí maso) bylo dokonce klasifikováno jako *karcinogenní* (skupina 1). Experti se shodují, že pravidelná konzumace tepelně upraveného červeného masa v denní dávce 50 g zvyšuje riziko onemocnění rakovinou tlustého střeva až o 18 %⁷. Z uvedeného vyplývá závažnost expozice xenobiotik prostřednictvím potravy lidskému organismu a nutnost se o tyto procesy zajímat.

1.2. Biotransformace xenobiotik

Lidský organismus je otevřená soustava, která si vyměňuje s okolím chemické látky a tepelnou energii a je také neustále vystavována exogenním fyzikálním, chemickým a biologickým vlivům. Vedle nervového a hormonálního systému, které dokáží reagovat na zásahy z vnějšího prostředí v řádu sekund si vyšší živočichové včetně člověka vytvořili efektivní systém biotransformačních reakcí, které mají za úkol zpracovat přijímané chemické látky. Proces biotransformace můžeme popsat jakožto enzymově katalyzované reakce, vedoucí k přeměně exogenních látek, tzv. xenobiotik, ale i některých endogenních sloučenin na polární oxidované deriváty anebo konjugáty za účelem jejich bezpečné eliminace z organismu. Hlavním detoxikačním orgánem savců jsou játra, kde probíhá převážná část reakcí, dále plíce, ledviny a gastrointestinální trakt⁸.

Mezi xenobiotika řadíme jak přírodní látky, tak sloučeniny uměle vytvořené člověkem: environmentální polutanty, léčiva, potravní aditiva, toxiny či chemické karcinogenní látky obsažené v potravě. Některé z nich přijímáme dobrovolně a cíleně (např. léčiva), některé nevědomě a pasivně (např. polutanty). Do krve se látky dostávají trávicím ústrojím, respiračním systémem nebo pasivně přes pokožku. Ve všech případech může být osud xenobiotik trojí: sloučeniny neinteragují s endogenním metabolismem a jsou vyloučeny v nezměněné podobě nebo se látky uloží ve tkáních a kumulují se nebo jsou sloučeniny biotransformovány za účasti příslušných enzymů do struktur připravených k exkreci⁹.

Proces biotransformace lze rozdělit do dvou fází, označovaných jako I. a II. fáze biotransformace. V první fázi dochází k zavádění polárních skupin na málo reaktivní nepolární látky nebo k odkrývání již existujících funkčních skupin. V druhé fázi pak dochází k vazbě xenobiotik na endogenní substráty za vzniku tzv. konjugátů připravených k exkreci. Obě dvě fáze na sebe nemusí nutně navazovat – exogenní látka může vstoupit přímo do druhé fáze nebo naopak vystoupit z první a být exkretována. Samotná exkrece, tedy transport xenobiotika z organismu prostřednictvím stolice, moči, žluči, potu nebo vydechaného vzduchu bývá někdy chybně označován jako třetí fáze.

V rámci biotransformačních reakcí obvykle dochází ke snížení biologické aktivity nebo toxicity, tzv. detoxikaci látek, kdy jsou metabolity „inaktivovány“ a vyloučeny z těla. Některá xenobiotika však mohou být aktivována z pohledu biologické aktivity anebo se stávají více toxickými či dokonce karcinogenními. Tento proces je označován jako tzv. metabolická aktivace. Aktivační a detoxikační procesy nelze od sebe vzájemně oddělit,

protože tytéž enzymy se mohou podílet na detoxikaci jedné chemické látky a zároveň způsobit aktivaci látky jiné¹⁰. Jednotlivé procesy, jejich ovlivnění jinými exogenními látkami a zejména ovlivňování aktivity biotransformačních enzymů tedy musí být intenzivně studováno s cílem identifikovat potenciální rizika spojená např. s bioaktivací prokarcinogenních látek.

1.2.1. První fáze biotransformace

Během první (derivatizační) fáze dochází k přeměně xenobiotik na hydrofilní sloučeniny. Tyto děje jsou lokalizovány v endoplasmatickém retikulu buněk. Za katalýzy enzymů zde dochází k odkrývání nebo zavádění polárních skupin (např. -OH, -COOH a -NH₂ atd.) do struktury chemické látky, což vede k tvorbě polárních a tím snadněji metabolizovaných sloučenin. Biotransformačním reakcím nepodléhají jen cizorodé látky, ale i endogenní molekuly jako např. hormony či žlučové kyseliny. V závislosti na biologických účincích a struktuře se pak metabolismus sloučeniny může lišit.

Na reakcích první fáze se podílí řada enzymů, z nichž nejdůležitější jsou cytochromy P450, dále peroxidasy, flavinové monooxygenasy, monoaminoxidasy a další. Ze všech derivatizačních reakcí je nejvýznamnější oxidace, zejména prostřednictvím oxidas se smíšenou funkcí (MFO z angl. *Mixed Function Oxidase*), což je skupina enzymů katalyzujících oxidační a oxygenační reakce a u eukaryotických organismů se nachází v membráně hladkého endoplasmatického retikula¹⁰. Klíčovými enzymy MFO jsou cytochromy P450 (CYP), které jsou zapojeny do metabolismu jak endogenních sloučenin (např. steroidních látek), tak i xenobiotik (např. léčiv). CYP hrají důležitou roli např. při biotransformaci účinných látek obsažených v léčivých přípravcích. Jejich inhibice může vést ke hromadění biologicky aktivních sloučenin v organismu a předávkování danou látkou, zatímco indukce a aktivace může naopak snížit účinnost farmaceutických přípravků¹¹. CYP se také podílejí na již zmíněném nežádoucím důsledku biotransformace – metabolické aktivaci prokarcinogenů (např. benzo[*a*]pyrenu). Aktivované karcinogeny jsou vysoce reaktivními intermediáty, které tvoří adukty s DNA¹².

1.2.2. Druhá fáze biotransformace

V rámci druhé fáze biotransformace dochází ke konjugaci endogenních hydrofilních molekul na přeměňovaný substrát a z toho důvodu bývá tato fáze také nazývána jako konjugační. Pro tyto reakce je nezbytná přítomnost vhodné funkční skupiny na sloučenině. Zpravidla k jejímu zavedení či odkrytí dochází v I. fázi, pokud je již přítomna v nativní molekule, tato fáze se neuplatňuje. Původně méně hydrofilní sloučeniny jsou konjugačními reakcemi převedeny na snadněji exkretovatelné formy, které jsou vyloučeny z organismu. Procesem konjugace se většina cizorodých látek s biologickými účinky stává inaktivními metabolity. Některá xenobiotika, zejména prokarcinogeny, mohou být, stejně jako tomu je u 1. fáze, konjugací převedeny na vysoce nestabilní sloučeniny, které se rozpadají na elektrofilní intermediáty, dále interagující s endogenními sloučeninami.

Reakce II. fáze probíhají převážně v cytosolu buňky a jsou katalyzovány transferasami, které konjugují příslušné endogenní substráty. K hlavním enzymům patří UDP-glukuronosyltransferasy (UGT), glutathion-S-transferasy (GST), methyltransferasy, *N*-acetyltransferasy (NAT) a sulfotransferasy (SULT)¹³. Reakce druhé fáze doplňují minoritní konjugační reakce s glycinem, taurinem, alaninem nebo s některými aromatickými aminokyselinami. Tyto reakce probíhají v matrix mitochondriích, kde jsou aminokyseliny aktivovány na acyl-CoA⁸.

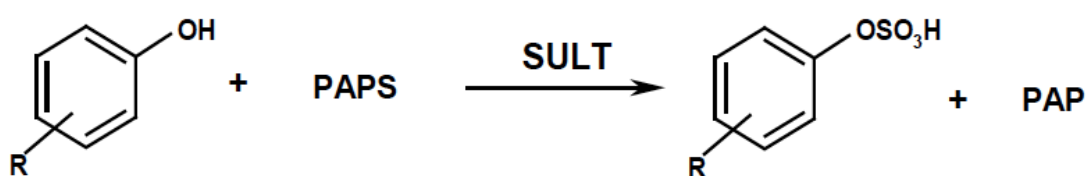
1.2.2.1. Sulfátová konjugace

Sulfátová konjugace, v literatuře známá také pod termíny sulfonace či sulfatace je jedna z mnoha metabolických reakcí, při kterých dochází k přenosu sulfonové skupiny SO_3^- na širokou škálu sloučenin. Tyto reakce jsou katalyzovány transferasami, které lze rozdělit na membránové sulfotransferasy (ST) a cytosolární sulfotransferasy (SULT). První zmíněné katalyzují sulfátovou konjugaci větších molekul, jako jsou sacharidy či proteiny. Jsou lokalizovány v membránách Golgiho aparátu a nepodílejí se na biotransformačních reakcích. Mezi zástupce této podskupiny patří např. tyrosylové ST, které se zúčastňují posttranslačních modifikací proteinů nebo rodina sacharidových ST, které hrají důležitou roli v extracelulární signalizaci a katalyzují vznik nejrozličnějších sacharidových struktur sloužících k buněčné adhezi^{14,15}. Cytosolární sulfotransferasy se na rozdíl od membránových podílejí na biotransformačních reakcích menších endogenních biomolekul

a také cizorodých látek – xenobiotik¹⁶. Vzhledem k tomu, že jsou cytosolární sulfotransferasy předmětem této práce, jsou dále podrobněji popsány v následující kapitole.

1.3. Cytosolární sulfotransferasy

Sulfatace je jedna ze základních konjugčních drah spadajících do druhé fáze biotransformace, která je zodpovědná za detoxikaci a následnou eliminaci menších endogenních i exogenních látek. Tyto reakce jsou katalyzovány rodinou cytosolických sulfotransferas (SULT), které katalyzují přenos SO_3^- skupiny z koenzymu 3'-fosfoadenosinu-5-fosfosulfátu (PAPS) na širokou škálu aktivovaných substrátů, které buď prošly první fází biotransformace nebo již obsahují vhodné aminové či hydroxylové skupiny (obr. 1). Substráty, mezi které patří hormony, steroidní látky, vitamíny či léčiva a jiné cizorodé látky, jsou následně procesy *O*-sulfatace či *N*-sulfatace přeměněny na obvykle biologicky neaktivní metabolity, které jsou následně eliminovány z těla, nejčastěji v podobě moči či žluči. Některá xenobiotika naopak prostřednictvím sulfatace získají nežádoucí biologickou reaktivitu. Tento proces metabolické aktivace je běžný u cizorodých látek z potravy či ovzduší a vede ke vzniku vysoce reaktivních intermediátů, které mohou působit jako chemické karcinogeny a mutageny¹⁷.



Obr. 1: Schéma obecné biotransformační reakce za katalýzy sulfotransferasy a účasti koenzymu. (převzato z¹³)

1.3.1. Nomenklatura a klasifikace SULT

Nomenklaturní systém SULT nebyl vždy jednotný a neustále se vyvíjí na základě nových poznatků o jednotlivých enzymových isoformách. Mnoho členů lze ve starší literatuře nalézt pod různými názvy, v této práci je však použita klasifikace na základě posledních publikací^{18–20}, kde se označení jednotlivých enzymů řídí nejnovějšími poznatky.

Pro lepší orientaci v práci je zde uvedeno základní označení isoforem, které se řídí několika pravidly:

- Jednotlivé rodiny enzymů se označují čísly 1 (např. SULT1).
- Podrodiny se označují velkým tiskacím písmenem (např. SULT1A)
- Jednotlivé isoformy se rozlišují číslicí (např. SULT1A1)
- Isoformy, které se liší svou allelickou variantou se označují hvězdičkou a příslušným číslem (např. SULT1A1*2)
- Isoformy s různými aminokyselinovými sekvencemi, které jsou kódované stejným genem se rozlišují označením „_vx“, kde „x“ je zkratka pro pořadové číslo varianty (např. SULT2B1_v1 a SULT2B1_v2)
- Druhový původ enzymu se značí malým písmenem jako předpona (např. rSULT = „r“ z anglického „rat“ jako potkan, hSULT = „h“ z anglického slova „human“ jako člověk apod.)

Zastoupení a míra exprese jednotlivých isoforem se mezi druhy může částečně lišit – ne všechny enzymové rodiny jsou zastoupeny u všech druhů. Předmětem zájmu jsou zde vzhledem k vybranému modelovému organismu tedy hlavně potkaní isoformy a isoformy lidského druhu.

Všechny lidské cytosolární enzymy jsou součástí tzv. SULT super-rodiny, která má 13 členů a sdílí sekvenční homologii alespoň 45 % (v rámci podrodin je to pak 65 % a více). Super-rodina hSULT se dále dělí do 4 skupin SULT1, SULT2, SULT4 a SULT6, z nichž největší metabolický význam mají hlavně první dvě:

hSULT1

Rodina hSULT1 má 8 členů, které jsou dále rozděleny do 4 podrodin: **1A1**, **1A2**, **1A3/4**, **1B1**, **1C2**, **1C3**, **1C4**, and **1E1**. Protein SULT1A3/4 je specifický tím, že je produktem dvou genů *1A3* a *1A4*, které jsou od sebe odlišeny pouhou duplikací, proto oba kódují stejný protein. Enzymy této skupiny jsou primárně zodpovědné za metabolismus fenolických endogenních molekul a xenobiotik.

Příklady metabolizovaných substrátů: *p*-nitrofenol, 1-naftol, minoxidil, OH-PhIP, OH-AAF, E₁, E₂, DHEA, iodothyroidní hormony, dopamin, noradrenalin.

hSULT2

Rodina hSULT2 obsahuje tři členy: **2A1**, **2B1_v1** a **2B1_v2**, z nichž poslední dva jsou kódovány jedním genem. Enzymy této skupiny vykazují téměř výhradně substrátovou specifitu vůči steroidním sloučeninám.

Příklady metabolizovaných substrátů: DHEA, testosteron, E₂, cholesterol, žlučové kyseliny.

hSULT4

Tato rodina je reprezentována pouze jedním enzymem **4A1**, který je výhradně exprimován v mozkové tkáni, kde pravděpodobně ovlivňuje některé nervové funkce²¹. Možné substráty tohoto enzymu byly zatím identifikovány pouze *in vitro* – patří mezi ně např. estron, *p*-nitrofenol a 2-naftol²².

hSULT6

Rodina hSULT6 obsahuje také pouze jednoho člena **6A1**, který byl detekován ve tkáni varlat a ledvin^{23,24}. V rámci metabolismu endogenních a exogenních sloučenin zatím nebyl identifikován žádný jeho substrát.

Výskyt a exprese potkaních forem sulfotransferas je lidským orthologům velmi blízká, avšak přesto zde některé isoformy chybí a některé jsou naopak navíc. Orthologní enzymy se mohou lišit i v metabolickém uplatnění – zatímco rodina hSULT1C je u lidí pravděpodobně ne tak významná pro metabolismus xenobiotik, u potkanů rodina rSULT1C metabolicky aktivuje prokarcinogeny a promutageny^{25,26}.

Stejně jako lidská super-rodina hSULT, i ta potkaní obsahuje 13 enzymů, které jsou zastoupeny prostřednictvím tří rodin. Většina enzymů jsou orthologní:

rSULT1

Rodina rSULT1 zahrnuje 8 členů: **1A1, 1B1, 1C1, 1C2, 1C2A, 1D1, 1E1**, z nichž většina vykazuje substrátovou specifitu vůči fenolickým sloučeninám jak endogenního, tak exogenního původu, podobně jako je tomu u hSULT.

rSULT2

Rodina rSULT2 zahrnuje 5 členů **2A1, 2A2, 2A3, 2B1a a 2B1b**. Enzym rSULT2A1 katalyzuje sulfonace steroidních sloučenin, podobně jako jeho lidský ortholog. Enzym rSULT2A2 byl zatím detekován jen v potkaní a myší tkáni a nemá orthologní zastoupení u lidí. Enzym rSULT2A3 je exprimován v jaterní tkáni potkanů a někdy je též nazýván žlučová sulfotransferasa. Enzym rSULT2B1a katalyzuje konjugaci pregnenolonu, enzym rSULT2B1b cholesterolu²⁷.

rSULT4

Rodina rSULT4 má stejně jako lidská hSULT4 pouze jednoho zástupce **4A1**. Sekvence enzymu rSULT4A1 z 99 % odpovídá hSULT4A1, z toho důvodu bude pravděpodobně jeho fyziologická funkce stejná jako u lidského orthologu²¹.

1.3.2. Tkáňová distribuce SULT

Přestože jsou hlavním detoxikačním orgánem játra, sulfotransferasy se vyznačují širokou tkáňovou distribucí, která se liší mezi druhy. K nejdůležitějším detoxikačním orgánům patří také tenké střevo, které je se svou délkou (zhruba 7 m u lidí a 90 cm u potkanů) a absorpční plochou významným orgánem umožňujícím interakce s jinými látkami, přijímanými spolu s potravou. Dalšími důležitými orgány biotransformačních reakcí jsou plíce, do kterých se xenobiotika dostávají prostřednictvím inhalovaného vzduchu a též ledviny.

Enzymy mohou být detekovány na dvou úrovních – mRNA a proteinu. Zatímco enzym může být prokázán na základě měření specifické aktivity či detekce proteinu

pomocí metody Western blot, na úrovni genetické informace je existence enzymu predikována na základě stanovení mRNA. Obě stanovení se tak mohou vzájemně doplnit, ale i zásadně lišit. Mezi nejlépe charakterizované enzymy patří ty lidské, pro účely experimentálního výzkumu je potřebné se zabývat i lokalizací a specifitou potkaních a myších isoform.

Enzymové vybavení jater a tenkého střeva potkanů se zřejmě liší, je však potřeba zmínit, že studie často dochází k různým výsledkům. Isoformy hSULT1A1 a hSULT1B1 jsou hlavními enzymy podílejícími se na metabolismu xenobiotik u lidí a společně zodpovídají za téměř 70 % sulfotransferasové aktivity v játrech²⁸. Isoforma SULT1B1 je také majoritně exprimovaná isoforma v tenkém střevě, kde pokrývá více jak 1/3 sulfatačních reakcí. Isoforma hSULT1A1 spolu s isoformami 1A3 a 1E1 téměř představuje zbylé reakce²⁸. Oproti tomu, rSULT1A1 byly imunodetekovány v játrech, avšak žádné proteiny nebyly detekovány ani v tenkém ani v tlustém střevě²⁹. Dále, dle studie Moona a kol.²⁹ nebyly v tenkém střevě lokalizovány žádné významné isoformy rSULT, což nekoreluje se studiemi, které zkoumají metabolismus a indukční efekty xenobiotik na právě tyto enzymy v tenkém střevě. Studie Dunna a kol.³⁰ zkoumající expresi rSULT na úrovni mRNA naopak dokazuje, že rSULT1A1 se exprimuje jak v játrech, tak i v tenkém střevě a dalších tkáních³⁰. Isoforma rSULT1B1 byla taktéž detekována v játrech a dále v malém množství v tlustém střevě.

Úloha některých SULT zatím nebyla objasněna – enzym hSULT4A1 byl identifikován v mozkové tkáni, což je z pohledu jejich role v biotransformaci zcela netypické²¹. Některé rSULT enzymy jsou také exprimovány v jednotlivých tkáních v závislosti na pohlaví. Například rSULT1C1 a rSULT1E1 se výhradně exprimují v dospělosti pouze u samců, a exprese rSULT1A1 je skoro 2x větší u samců než u samic^{31,32}. Z toho důvodu je třeba brát ohled jak na mezidruhové rozdíly, tak na rozdíly způsobené pohlavím.

1.3.3. Struktura SULT a mechanismus jejich katalýzy

Sulfotransferasy patří mezi dimerní, rozpustné α/β -globulární proteiny, jejichž struktura se vyznačuje čtyřmi nebo pěti β -strukturami, obklopenými α -helixy. Katalytické místo spolu s místem vázajícím koenzym PAPS je tvořeno β -strukturami s typickými „strand-loop-helix“ a „strand-turn-helix“ motivy. Vazebné místo koenzymu PAPS je

vysoce konzervované co se týče aminokyselinového složení a mutace pouhých tří aminokyselinových zbytků vede ke kompletní inaktivaci enzymu³³. Oproti tomu vazebná místa zodpovědná za vazbu substrátu jsou velmi variabilní, což se projevuje na široké substrátové specifitě jednotlivých isoform, které jsou schopné katalyzovat přeměnu stovek sloučenin³⁴.

Přesný mechanismus katalýzy SULT byl dlouho nejasný. Až nedávno bylo objeveno, že selektivita a katalytická účinnost enzymů je regulována homotropními alosterickými interakcemi mezi dvěma navázanými molekulami PAPS v aktivních místech dimerního enzymu³⁵. Koenzym je určujícím a zároveň limitujícím faktorem celé katalýzy i z toho důvodu, že odstupující molekula PAP s již chybějící sulfátovou skupinou je zároveň kompetitivním inhibitorem SULT³⁶. Z hlediska mechanismu se tedy jedná o sekvenční proces katalýzy, který je náhodný nebo uspořádaný.

1.3.4. Role SULT v karcinogenezi

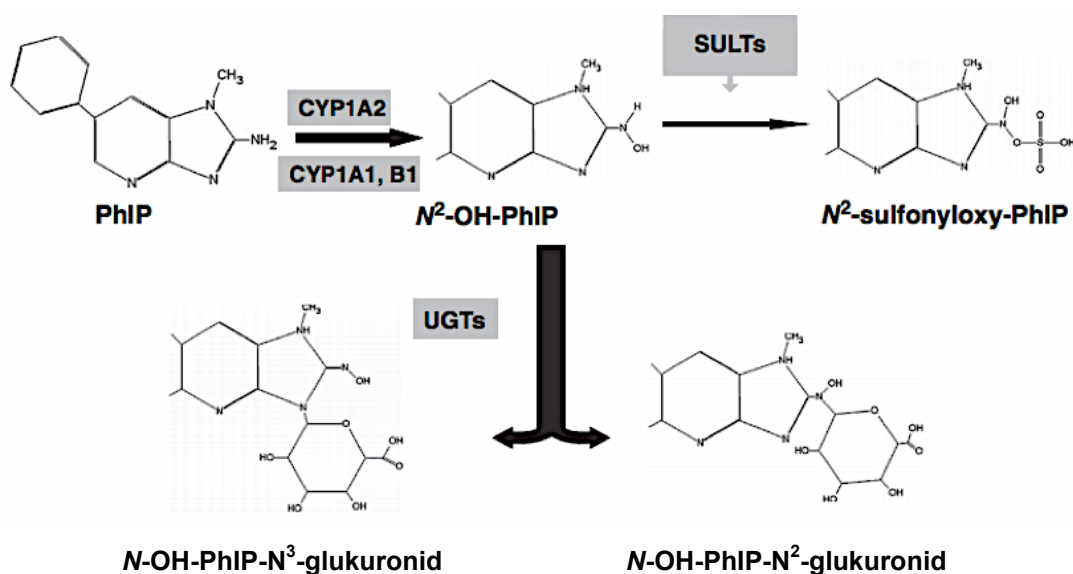
Vzhledem k tomu, že jsou SULT enzymy se širokou substrátovou specifitou, představují riziko tvorby toxických metabolitů. Některá xenobiotika se karcinogeny teprve stávají v průběhu biotransformačních reakcí, z toho důvodu se nazývají prokarcinogeny nebo sekundární karcinogeny, neboť vyžadují tzv. metabolickou aktivaci. Z xenobiotik vystupujících z první fáze biotransformace, do kterých již byla zavedena vhodná polární skupina, mohou vznikat po konjugaci se sulfátem velmi nestabilní intermediáty, které se spontánně rozpadají na sloučeniny obsahující elektrofilní nitréniové ionty. Tyto vysoce reaktivní, aktivované sloučeniny pak mohou tvořit adukty s bázemi deoxyribonukleotidových kyselin, což má za následek mutagenní a karcinogenní účinky na buňku³⁷.

Na metabolismu prokarcinogenů a karcinogenů se podílejí hlavně enzymy rodin SULT1 a SULT2 a to jak u lidí, tak i u potkanů. U potkaních modelů probíhají biotransformační reakce převážně v játrech, u člověka je extrahepatální výskyt SULT mnohem významnější, a proto je důležité vedle jater studovat i další biotransformační orgány.

První objevený prokarcinogen, podléhající metabolické aktivaci, byl 2-acetylaminofluoren (AAF)³⁸. AAF podléhá nejprve *N*-hydroxylaci za katalýzy enzymu CYP1A2 a následně konjugaci s aktivním sulfátem za katalýzy hSULT1A1 nebo

hSULT1A2, ale také rSULT1A1^{38,39}. Touto konjugací vzniká nestabilní ester *N*-sulfoxy-AAF. Po spontánním uvolnění sulfátu vzniká elektrofilní nitréniový iont, reagující s nukleofilními sloučeninami. Této metabolické aktivaci tedy podléhají hlavně xenobiotika obsahující atom dusíku, např. *N*-hydroxyarylaminy či heterocyklické aminy⁴⁰. Obecně tedy platí, že aktivované sloučeniny pocházejí hlavně ze skupin benzylických a allylických alkoholů, aromatických hydroxylaminů a sloučenin obsahujících jedno nebo dvě benzenová jádra.

Mezi xenobiotika podléhající metabolické aktivaci katalyzované SULT patří i jeden z nejrozšířenějších chemických karcinogenů v potravě, vznikající při vysokoteplotní přípravě masa včetně rybího, 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) (obr. 2). Tento prokarcinogen je nejprve *N*-hydroxylován za katalýzy cytochromu P450, nejčastěji isoformy CYP1A2, na intermediální metabolit *N*²-hydroxy-PhIP, který je dále esterifikován za katalýzy SULT1A1 nebo SULT1A2 na *N*²-sulfonyloxy-PhIP, či minoritně za katalýzy *N*-acetyltransferasy 2 na *N*²-acetoxy-PhIP (není zobrazeno)^{41,42}. Intermediální metabolit se zavedenou hydroxylovou skupinou však může podléhat i přímým detoxikačním procesům za katalýzy UDP-glukuronosyltransferas. Výsledné metabolity, glukuronidy, jsou eliminovány z těla bez vedlejších bioaktivních účinků⁴³.



Obr. 2: Biotransformace prokarcinogenu 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridinu (PhIP). Prokarcinogen PhIP je v první fázi biotransformace hydroxylován. Tento meziprodukt je buď dále konjugován s kys. glukuronovou na stabilní detoxikační metabolity nebo metabolicky aktivován za katalýzy SULT na nestabilní *O*-ester. (převzato a upraveno z⁴⁴)

1.3.5. Modulace aktivity a exprese SULT

Enzymy jsou regulovatelné a to jak vlivem endogenních mechanismů, tak i vlivem exogenních látek. Regulace může být v zásadě dvojitá, a to jak na úrovni aktivity již nativního proteinu, tak na úrovni genové exprese.

Ovlivnění aktivity SULT, tzv. modulace, je důležitý jev, který může ovlivnit metabolismus endogenních i exogenních látek. Významnými modulátory jsou různá xenobiotika, která se vážou do katalytického centra enzymu a nejčastěji inhibují jeho aktivitu. Vzhledem k tomu, že SULT hrají důležitou roli i v regulaci tvorby a eliminace hormonů, je důležité se věnovat potenciálním dopadům inhibice na zdraví člověka. Inhibice sulfotransferas xenobiotiky je široce studována a již bylo charakterizováno mnoho látek z řad léčiv, chemických polutantů, potravních aditiv, ale i látek běžně se nacházejících v potravě (viz shrnutí³⁴). Mezi nejsilnější přírodní inhibitory patří flavonoid kvercetin, který vykazuje silnou inhibici vůči metabolismu řady substrátů v různých tkáních. Přehled flavonoidních látek s inhibičními účinky na SULT je v tab. 1, str. 27.

Inhibice sulfotransferas může mít na organismus nejen pozitivní, ale i negativní dopady. Na obr. 2, str. 20 je znázorněna část metabolismu prokarcinogenu PhIP, popsaná v předešlé kapitole. Ze schématu vyplývá, že inhibice SULT by potlačila tuto metabolickou dráhu vedoucí k aktivaci prokarcinogenu a naopak podpořila detoxikační procesy. Pokud by došlo k indukci SULT, metabolická aktivace prokarcinogenu by byla naopak podpořena. Inhibice SULT může také způsobit hromadění některých látek, které tak zůstanou v organismu a jejich zvýšené množství pak pro tělo může znamenat potenciální toxicitu. Jako příklad lze uvést metabolismus paracetamolu (acetaminofen), který je známým antipyretikem a podává se při léčbě nachlazení či horečky. Jednu z eliminačních drah tvoří i konjugace se sulfátem. Inhibice SULT tedy může vést k prodloužení jeho farmakologických účinků a ke zvýšené zátěži jater, způsobené reaktivními metabolity⁴⁵.

Steroidní hormony estrogény a jejich prekurzor dehydroepiandrosteron (DHEA) jsou za normálních podmínek transportovány k cílovým buňkám krevním řečištěm jako sulfatované estery, které vznikají za katalýzy SULT1E1 a SULT2A1. U cílové buňky pak dochází pomocí sulfatas k odstranění sulfátové skupiny ze steroidní sloučeniny a následně k jejímu transportu do buňky. Inhibice SULT zodpovědných za konjugaci hormonů tedy může narušit dostupnost estrogenů v cílových buňkách, což může mít za následek endokrinní defekt⁴⁶. Sloučeniny, které inhibují příslušné enzymy se tedy chovají jako tzv. endokrinní „disruptory“⁴⁷.

Isoformy SULT1B1 a SULT1E1 jsou zodpovědné za katalýzu sulfatace hormonů štítné žlázy⁴⁸. Hydroxylované metabolity polychlorovaných bifenyků jsou silné kompetitivní inhibitory sulfatace hormonu thyroxinu, katalyzovaného SULT1E1⁴⁹. Inhibice SULT1E1 může vést k narušení hormonální regulace thyroidními hormony a tudíž opět ovlivnit celkový metabolismus organismu.

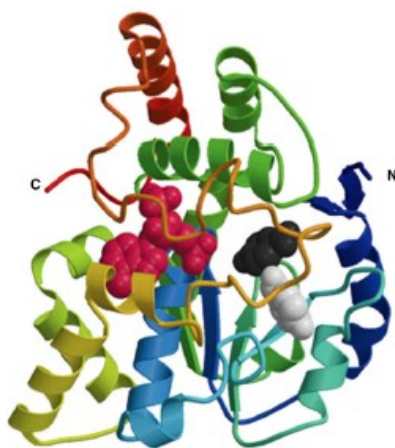
Množství SULT a tím i jejich aktivita může být ovlivněna i na úrovni genetické informace. Konstitutivní isoformy SULT jsou vytvářeny organismem bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost specifického stimulu. Tzv. indukibilní isoformy (např. SULT1A1, 1B1, 1E1 nebo 2A1) jsou responzivní vůči exogenním induktorům či represorům, které mohou způsobit jejich zvýšenou či sníženou produkci. Induktory/represory mohou být exogenní látky různého původu, které se dostávají do organismu z okolního prostředí. V buňce se váží na jaderné receptory, které jsou zapojené do iniciace transkripce genů. Mezi nejběžnější patří receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR; z angl. „aryl-hydrocarbon receptor“), jehož prostřednictvím jsou indukovány např. některé cytochromy P450⁵⁰. Regulaci přes nukleární receptory podléhají zejména isoformy SULT1E1, SULT2A1 a SULT2B1, které jsou zodpovědné za sulfataci steroidních hormonů. Tyto sulfotransferasy jsou modulovány přes více typů receptorů, mezi které patří např. receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem (PPAR), jaterní receptory X (LXR) nebo receptory příbuzné estrogenům (ERR)⁵¹. Regulace SULT1 podrodiny, která je zodpovědná za sulfataci převážně fenolických sloučenin, většinou přímo přes nukleární receptory neprobíhá a mechanismus jejich indukce zahrnuje komplexnější kooperaci transkripčních faktorů a jejich vazebných míst. Sloučeniny mohou indukovat tvorbu enzymů také nepřímo, prostřednictvím stabilizace mRNA či samotného proteinu.

Gastrointestinální trakt je hlavním místem metabolismu chemických prokarcinogenů a promutagenů z potravy, které podléhají metabolické aktivaci enzymovou katalýzou některými biotransformačními enzymy, včetně SULT. Indukce SULT na úrovni genové exprese a z toho vyplývající vyšší množství enzymu v organismu tedy může mít za následek potenciaci metabolické aktivace prokarcinogenů a tím se tedy nepřímo podílet na zvýšené míře toxicity těchto látek. Indukční efekty byly již prokázány u několika přírodních látek z řad fytochemikálií, patří mezi ně i některá léčiva např. methotrexát, který se používá při léčbě různých typů rakoviny a autoimunitních onemocnění⁵².

1.3.6. Enzym SULT1A1

Enzym SULT1A1, dříve nazývaný jako fenolická nebo termostabilní sulfotransferasa je nejdéle studovaným členem super-rodiny SULT a je také nejdetailněji charakterizovanou SULT (obr. 3). Lidská isoforma vykazuje velmi širokou substrátovou specifitu pro malé fenolické molekuly a hraje významnou roli v metabolismu karcinogenních látek.

Mezi sulfatované substráty patří jak endogenní látky, tak exogenní prokarcinogeny a léčiva, např. *p*-nitrofenol, *p*-naftol, dopamin, thyroidní hormony, estradiol, OH-PhIP, OH-AAF či léčiva jako acetaminofen, tamoxifen a minoxidil⁵³. Důležitou roli v této metabolické všestrannosti hraje aktivní místo enzymu, které je schopné přijmout širokou škálu látek. V této práci je studováno ovlivnění exprese a aktivity SULT1A1 flavonoidními látkami a tím tedy i potenciální dopady na metabolismus sloučenin.

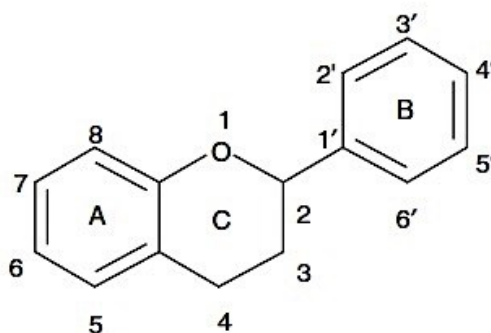


Obr. 3: Krystalová struktura hSULT1A1 s navázaným koenzymem PAP (tmavě růžová) a dvěma molekulami *p*-nitrofenolu (bílá a šedá). (převzato a upraveno z⁵⁴)

1.4. Flavonoidní látky

Flavonoidní látky tvoří významnou skupinu přírodních polyfenolických sloučenin, které jsou přijímány v lidské potravě. Z chemického pohledu se jedná o sekundární metabolity rostlin, které jsou přítomny v zelenině, ovoci, nápojích jako je káva či čaj, bylinách a houbách⁵⁵. V rámci rostlinného organismu tyto látky zodpovídají např. za pigmentaci květů a plodů, působí proti volným radikálům, podílí se na chemické signalizaci či chrání rostlinu proti patogenním činitelům⁵⁶. Pro svou rozmanitost a široké spektrum biologických účinků na savčí organismy včetně člověka jsou předmětem intenzivních výzkumů, které převážně proklamují jejich pozitivní vliv na zdraví.

Doposud bylo identifikováno více jak 8000 flavonoidních sloučenin, které zpravidla sdílejí skelet flavanu (obr. 4), tvořeného z heterocyklického uhlovodíku chromanu substitucí fenylové skupiny. Velké množství flavonoidních sloučenin je umožněno značnou variabilitou v substituování základních kruhů A, B a C hlavně hydroxylovými a methoxy-skupinami. Od flavanu se zpravidla odvozuje 7 tříd flavonoidů, které se od sebe liší jednak stupněm oxidace a jednak polohou fenylového kruhu: flavony, flavanoly, flavonoly, flavanony, anthokyaniny, isoflavony a chalkony^{57,58}.



Obr. 4: Základní struktura flavanu s číslováním jednotlivých uhlíkových atomů.
(převzato z⁵⁹)

1.4.1. Metabolismus flavonoidních sloučenin

Flavonoidní látky patří spolu s vitamíny a minerály mezi tzv. mikrosložky lidské výživy. Nepodléhají energetickému metabolismu za tvorby energie (ATP), jako je tomu u sacharidů, bílkovin a tuků. Vykazují specifickou absorpci, vlastní metabolismus a finální exkreci z organismu. V přírodě se nejčastěji vyskytují vázány β -glykosidovou vazbou na sacharidové jednotky. Po vstupu do gastrointestinálního traktu může k jejich absorpci docházet už v žaludku a v prostřední tenkému střevu, ze kterého může být část vedena portální žilou k játrům. Vlastní metabolismus probíhá hlavně v prostředí střev, kde jsou flavonoidy hydrolyzovány mikroorganismy na volné flavonoidní látky (tzv. aglykony) a sacharidovou část. Obě podoby flavonoidů, jak aglykon tak glykosidová forma, mohou být v těle biologicky aktivní⁶⁰. Z dosavadních studií vyplývá, že určení biologicky aktivnější formy závisí jednak na konkrétní sloučenině a jednak na jejím biologickém účinku⁶¹. Volné aglykony jsou následně konjugovány s endogenními substráty za katalýzy biotransformačních enzymů. Mezi hlavní enzymy zapojené do procesů metabolismu flavonoidních látek patří UDP-glukuronosyltransferasy, *N*-acetyltransferasy a sulfotransferasy, které připojením endogenních sloučenin zvýší rozpustnost aglykonů a umožní jejich exkreci v podobě žluči či moči z těla.

1.4.2. Biologické účinky flavonoidních látek

Flavonoidním látkám je přisuzováno mnoho zdraví prospěšných účinků, z nichž stojí v první řadě za zmínku jejich vysoký antioxidační potenciál. Organismy jsou neustále vystavovány volným radikálům, reaktivním formám kyslíku (ROS), které jsou „zhášeny“ účinným endogenním systémem, který zahrnuje jak některé enzymy (např. superoxid dismutasa), tak konkrétní látky (např. glutathion) či proteiny (např. laktoferin)⁶². Lidský organismus je však vystavován nemalému působení vnějších fyzikálních, chemických a biologických vlivů, na které základní ochrana často nestačí, což může vést k převaze negativních účinků a vzniku oxidačního stresu. Posílení antioxidační kapacity organismu je tak jedním z předpokladů prevence vzniku onemocnění, vznikajících jako důsledek působení volných radikálů, zejména např. diabetu, aterosklerózy, rakoviny či např. Alzheimerovy choroby⁶³.

Mezi další pozitivní účinky patří například jejich schopnost snižovat míru zánětu, ovlivňovat vazodilataci cév či v neposlední řadě modulovat aktivitu a expresi enzymů,

zodpovědných za detoxikaci karcinogenních látek. Zejména se jedná o enzymy první a druhé fáze biotransformace, cytochromy P450, glutathion-S-transferasy, UDP-glukuronosyltransferasy, *N*-acetyltransferasy a sulfotransferasy^{64,65}. Pro jejich slibný terapeutický potenciál se tedy staly významnými chemopreventivními látkami, tj. sloučeninami, které mají schopnost pozdržet, zabránit či zvrátit jednotlivé stupně karcinogeneze⁶⁶.

Z uvedených biologických účinků vyplývá, že jsou flavonoidní látky schopné interagovat s endogenním metabolismem a ovlivňovat jeho aktivitu. V tomto ohledu se o flavonoidech převážně mluví v pozitivním slova smyslu jako o látkách, které mají protektivní účinky, což vede ke stále se zvyšující oblibě a také k růstu trhu s koncentrovanými flavonoidy ve formě doplňků stravy. Je však potřeba vzít v úvahu, že konzumace vysokých dávek může být pro člověka škodlivá a je potřeba pečlivě studovat i jejich potenciální negativní efekty na lidský organismus a synergické působení většího počtu bioaktivních sloučenin. Některé výzkumy již naznačily, že flavonoidní látky mohou mít cytotoxické, mutagenní a pro-oxidační účinky^{58,67}. Vzhledem k tomu, že jsou metabolizovány v rámci biotransformačních drah, musí být brán ohled i na jejich možné nežádoucí interakce s enzymy první a druhé fáze biotransformace, které jsou mimo jiné zodpovědné za metabolickou aktivaci prokarcinogenů a promutagenů. Jejich toxické účinky mohou být i nepřímé a to např. prostřednictvím inhibice enzymů, zodpovědných za metabolismus léčiv⁶⁸.

1.4.3. Modulace aktivity a exprese biotransformačních enzymů flavonoidy

Biotransformační reakce vedou převážně k bezpečnému metabolismu xenobiotik a jejich snadnější exkreci z těla. V rámci těchto procesů může ale také docházet k opačnému efektu. Prokarcinogenní látky mohou být za katalýzy enzymů biotransformovány na vysoce reaktivní elektrofilní metabolity, které mají karcinogenní a mutagenní účinky. Navzdory záměru detoxikovat tedy indukce těchto enzymů flavonoidními látkami může mít naopak za následek potenciaci karcinogeneze. Inhibiční a indukční efekty některých flavonoidních sloučenin na enzymy I. a II. fáze biotransformace jsou prezentovány v tab. 1, str. 27.

Z dostupné literatury vyplývá^{59,69}, že vlivy flavonoidních sloučenin na biotransformační enzymy stále ještě nebyly uspokojivě prozkoumány a to zejména u enzymů II. fáze biotransformace. Zatímco inhibice flavonoidními látkami probíhá nejčastěji na úrovni aktivity, zvýšení množství enzymu a tím i jeho aktivity probíhá téměř výhradně prostřednictvím indukce na úrovni transkripce příslušných genů.

Tab. 1: Příklady inhibičních a indukčních efektů flavonoidních látek na enzymy I. a II. fáze biotransformace.

Inhibiční efekt		Indukční efekt	
Flavonoid	Enzym	Flavonoid	Enzym
kvercetin	CYP1A2 ⁷⁰ CYP3A4 ⁷¹ GST-P1 ⁷² SULT1A1 ⁷³ SULT1E1 ⁷⁴ NAT1 ⁷⁵ SULT1A3 ⁷⁶	kvercetin	CYP1A1 ⁷⁷ UGT1A1 ⁷⁸ UGT1A6 ⁷⁹
flavon	CYP1A1 a CYP1A2 ⁸⁰ UGT1A1 ⁸¹ SULT1A1 ⁸²	flavon	UGT1A1 ⁷⁸
biochanin A	CYP1A1 a CYP1B1 ⁸³ CYP19 ⁸⁴	biochanin A	SULT1A1 a SULT2A1 ⁸⁵
genistein	CYP1A1 ⁸³ CYP1A2 ⁸⁶ SULT1A1 a SULT1E1 ⁷⁶	genistein	SULT1A1 ⁸⁷
kamferol	CYP1A2 ⁸⁸ CYP3A4 ⁸⁹ SULT1A1, SULT1A3 a SULT1E1 ⁷⁶	kamferol	UGT1A1 ⁹⁰
myricetin	CYP3A4 ⁸⁸ SULT1A1 ⁷³	kofoein	SULT1A1 a SULT2A1 ⁹¹

CYP = cytochrom P450; GST = glutathion-S-transferasy; NAT = *N*-acetyltransferasy;
SULT = sulfotransferasy; UGT = UDP-glukuronosyltransferasy

1.4.4. Studované flavonoidní látky

V této práci je studován vliv vybraných flavonoidních látek na zásadní enzym metabolismu xenobiotik, sulfotransferasu SULT1A1. Níže je uvedena krátká charakteristika studovaných flavonoidů.

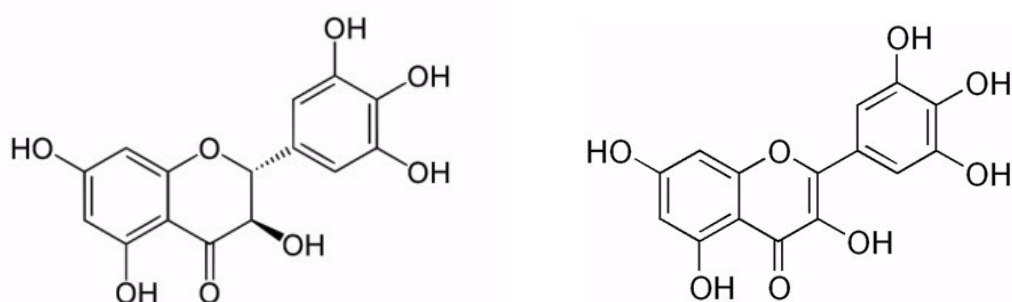
1.4.4.1. Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (DHM) je přírodní flavonoidní látka, která se ve vyšších koncentracích nachází v rostlinách *Hovenia dulcis* či *Ampelopsis grossedentata*. *H. dulcis*, u nás známá pod názvem dužistopka sladká, je rostlina pocházející z východní Asie, především Číny a Japonska, kde je po staletí využívána pro své hepatoprotektivní účinky v tradiční čínské medicíně⁹². Dihydromyricetin (obr. 5, str. 29) v literatuře také znám pod názvem ampelopsin, získal pozornost západní medicíny hlavně pro svou schopnost zmírnit příznaky intoxikace organismu ethanolem a podpořit detoxikační procesy jater. Studie naznačují, že DHM působí prostřednictvím obsazování receptorů pro neurotransmitter působící inhibičními účinky, kyselinu γ -aminomáselnou (GABA). Receptory pro GABA jsou při konzumaci alkoholických nápojů obsazovány právě ethanolem, což způsobuje známé sedativní účinky a příznaky opilosti. Spolu s antagonistickým efektem bylo na potkaních modelech dále zjištěno, že podání dihydromyricetinu pravděpodobně vede ke snížené potřebě a chuti konzumovat alkoholické nápoje⁹³. Některé studie přisuzují tyto účinky zvýšené aktivitě alkoholdehydrogenasy a acetaldehyddehydrogenasy^{94,95}, tyto enzymy jsou však konstitutivní a jejich indukce či aktivace dihydromyricetinem je tedy nepravděpodobná. Nelze vyloučit, že dihydromyricetin pouze maskuje akutní expozici organismu ethanolem a je tedy potřeba dalších studií k objasnění jeho působení v organismu. Navzdory tomu je však DHM vzhledem ke vrůstající konzumaci alkoholických nápojů brán jako potenciální léčivo alkoholové závislosti^{93,96}.

Mezi další účinky DHM na organismus patří jeho schopnost navyšovat antioxidační kapacitu organismu prostřednictvím účinného zhášení volných radikálů⁹⁷ a dle dosavadních studií jsou mu přisuzovány i protirakovinné⁹⁸ a neuroprotektivní účinky⁹⁹.

Pro své převážně pozitivní vlivy na metabolismus byl DHM uveden na trh v podobě volně prodejných doplňků stravy a je prezentován jako „lék na kocovinu“. Koncentrované preparáty se zatím v České republice neprodávají, ve Spojených státech amerických jsou ale v množství 150-350 mg na tabletu či kapsli již volně k dostání. Dávky

v uvedeném množství pravděpodobně nejsou pro člověka škodlivé, je ale důležité pokračovat ve studiu jeho účinků a to zejména jeho interakcí s biotransformačními enzymy, jejichž indukce nebo inhibice může způsobit narušení přirozených procesů metabolismu jak endogenních, tak exogenních látek. Zatím nebyly předloženy studie, které by zkoumaly indukční a inhibiční efekt dihydromyricetinu, klíčové flavonoidní látky, kterou se zabývá tato práce. Vzhledem k jeho vzrůstající oblibě v podobě doplňků stravy je tedy důležité se těmito možnými efekty zabývat.



Obr. 5: Strukturní vzorec dihydromyricetinu (vlevo) a myricetinu (převzato z¹⁰⁰)

1.4.4.2. Myricetin

Myricetin (MYR) je flavonoidní látka patřící do třídy flavonolů, která se přirozeně vyskytuje např. v lískových oříšcích, bobulovinách, houbách či různých druzích zeleniny. Je to také hlavní flavanol odrůd červeného vína Sauvignon, Sagrantino a Teroldego¹⁰¹. Strukturně si je velmi blízký s dihydromyricetinem, který je jeho intermediátem při biosyntetických reakcích, liší se pouze přítomností dvojné vazby mezi C2 a C3 uhlíkem (obr. 5)¹⁰². Z toho důvodu je zajímavé paralelně studovat jejich biologické účinky včetně inhibičního a indukčního působení na enzymy zodpovědné za metabolismus xenobiotik. Zatím byl prokázán inhibiční efekt myricetinu na enzymy I. fáze CYP3A4 a II. fáze SULT1A1 (viz tab. 1, str. 27). Mimo modulační účinky bylo prokázáno, že myricetin působí jako agonista estrogenních receptorů nádorových buněk prsní tkáně a jeho

pravidelný příjem v podobě červeného vína může hrát důležitou roli v rámci chemoprevence karcinomu prsu u žen po menopauze¹⁰³.

1.4.4.3. Biochanin A

Biochanin A (BIA) je zástupce třídy isoflavonů, flavonoidních látek vyskytujících se převážně v sóje a sójových produktech a také v populárních doplňcích stravy na bázi extraktu z červeného jetele. Isoflavony se dostaly do oblasti zájmu hlavně pro své účinky podobné pohlavním hormonům estrogenům. Z toho důvodu se řadí do skupiny tzv. fytoestrogenů. Afinita těchto látek k estrogením receptorům je sice řádově 100-1000x slabší, ale díky vysokému příjmu v doplňcích stravy se však účinkům estrogenů mohou rovnat¹⁰⁴. Aktivita fytoestrogenů se nemusí projevovat pouze prostřednictvím estrogenových receptorů, jejich účinky zasahují do syntézy proteinů, diferenciaci buněk, ale i modulace enzymů.

Biochanin A je v organismu převážně metabolizován procesy II. fáze biotransformace – konjugací se sulfátem nebo kyselinou UDP-glukuronovou – v tenkém střevě a játrech¹⁰⁵. Oxidační demethylací biochaninu A vzniká metabolit genistein, další z předních flavonoidních látek. Stejně jako převážná část fytochemikálií, i biochanin A a genistein mohou být hydrolyzovány mikrobiální florou v gastrointestinálním traktu a jako konjugované aglykony vstřebávány do krevního řečiště¹⁰⁶.

Biochanin A indukoval 3 isoformy sulfotransferas v tenkém střevě a játrech – SULT1A1, SULT2A1 a SULT1E1⁸⁵. Ve studii na potkaních modelech bylo potkanům podáváno 0-50 mg/kg/den této látky po dobu 7 dní. Indukce biochaninem A byla prokázána jak ve tkáni jater, tak v tenkém střevě. Pro své indukční účinky na SULT byla tedy tato látka vybrána jako komparativní sloučenina pro další stanovení vlivů flavonoidních látek na enzymy II. fáze.

1.4.4.4. Kvercetin

Kvercetin (KVR) patří k nejběžnějším fenolickým sloučeninám v lidské potravě a je také přírodní látkou nejdéle studovanou pro své pozitivní účinky na organismus. Stejně jako myricetin patří kvercetin do skupiny flavonolů, třídy flavonoidních látek, jejichž zástupci se hojně nachází v širokém spektru rostlinných potravin. Ve vysokých koncentracích je přítomen např. v cibuli, borůvkách, červené víně, čaji či jablkách¹⁰⁷.

Studie zabývající se biologickým účinky kvercetinu na lidský organismus poukazují zejména na jeho antioxidační, chemopreventivní, protizánětlivé a protirakovinné účinky (viz shrnutí¹⁰⁸). Antioxidační účinky kvercetinu jsou pravděpodobně dány hlavně jeho chemickou strukturou – konkrétním umístěním hydroxylových skupin v rámci jednotlivých kruhů⁶¹. Strukturní podobnost jednotlivých flavonolů však zřejmě není jediným určujícím faktorem míry antioxidačních a protizánětlivých účinků¹⁰⁹.

Kvercetin je relativně všestranným a silným inhibitorem aktivity enzymů I. a II. fáze biotransformace (viz tab. 1, str. 27). Již bylo provedeno několik studií, které dokazují jeho inhibiční efekt na aktivitu isoformy SULT1A1^{73,82}, s hodnotou IC₅₀ již okolo 60 nM⁷⁶. Na základě výzkumů byl použit v této studii jako referenční inhibitor pro stanovení inhibičního potenciálů studovaných flavonoidních látek.

2. CÍL PRÁCE

Obliba konzumace potravních doplňků, obsahujících koncentrované fenolické látky stále roste. I přes značné pozitivní účinky je ale nutné studovat i možné nepříznivé vlivy či nežádoucí interakce v rámci lidského metabolismu. Cílem této rigorózní práce bylo určit vliv vybraných flavonoidních látek na expresi a aktivitu sulfotransferasy SULT1A1, významného konjugačního enzymu cizorodých látek II. fáze biotransformace. Tato experimentální práce si kladla za úkol studovat indukční efekt flavonoidních látek biochaninu A, myricetinu a dihydromyricetinu na potkaním modelu, po aplikaci gaváží do žaludku. Dále byla studována schopnost těchto látek inhibovat aktivitu SULT1A1 *in vitro*.

Pro splnění cíle práce bylo potřeba realizovat tyto dílčí úkoly:

1. premedikovat potkany flavonoidními látkami,
2. izolovat a charakterizovat cytosolární a mikrosomální frakce z odebraných tkání jater a střev,
3. určit aktivitu SULT1A1 v cytosolárních vzorcích,
4. určit indukční efekt flavonoidních látek na SULT1A1 *in vivo* pomocí techniky Western blot,
5. určit inhibiční efekt flavonoidních látek na rekombinantní enzym SULT1A1.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál a chemikálie

Bio-Rad, USA

TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit 12 %, Precision Plus Protein™ Dual Color Standard, Precision Plus Protein™ Unstained Standard, 4X Laemmli Sample Buffer

Cypex

lidský rekombinantní enzym SULT exprimovaný v bakterii *E. coli*

isoformy SULT: SULT1A1*1 a SULT1A1*2, SULT1B1, SULT1C2

(skladováno při -80 °C)

Fluka, Switzerland

tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 2-merkptoethanol, α -tokoferol, dodecylsírán sodný (SDS), Coomassie brilliant blue R-250 (CBB)

Lach-Ner, Česká Republika

hydroxid sodný, kyselina chlorovodíková, glycerol, kyselina octová, ethanol, methanol, bromfenolová modř, chlorid sodný, dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan draselný, chlorid hořečnatý, persírán ammoný

LifeSpan BioSciences, Inc. (USA)

primární králičí protilátka proti SULT1A1 (LS-C295885)

Linde, Česká republika

zkapalněný dusík, suchý led

Millipore Corp., USA

Immobilion - NC transferová nitrocelulosová membrána

PML a.s., Česká republika

nízkotučné sušené mléko Laktino

Promega, USA

BCIP/NBT Color Development Substrate

Riedel-de Haën, Germany

dihydrát kvercetinu

Serva, Německo

N,N,N',N'-tetramethylendiamin (TEMED), Triton X-100, Tris/HCl

Setuza a.s., Česká republika

slunečnicový olej Vegetol

Shanghai APIchemical CO., China

dihydromyricetin

Sigma Aldrich, USA

biochanin A, *p*-nitrofenylsulfát (pNPS), 2-naftol, primární králičí protilátka připravená proti peptidu SULT1A1 (AV49134), hydrát lithné soli 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS), sekundární kozí protilátka konjugovaná s alkalickou fosfátasou proti králičí IgG (A3687), 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA)

Thermo Scientific

Microplate BCA Protein Assay Kit (Reagent A, Reagent B)

Tokyo Chemical Industry CO., LTD., Japan

myricetin

Whatman (USA)

Filtrační papír č.3

3.2. Přístroje

Analytické váhy

model Discovery, Ohaus (Švýcarsko)

Aparatura na elektroforézu

Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell System, Bio-Rad (USA)

Aparatura pro Westernblot

Trans-Blot[®] Turbo[™] Blotting System, Bio-Rad (USA)

Automatické mikropipety

Eppendorf (Německo)

Centrifugy

Centrifuga 5418, Eppendorf (Německo)

K23 a K24, Janetzki (Německo)

Ultracentrifuga Beckman Coulter Optima TM XPN-90 a LE-80K (USA)

Hermle Z 383 K (USA)

Detekční systém pro Western blot

SNAP i.d[®], Millipore corp. (USA)

Elektrický zdroj

PowerPac Basic, Bio-Rad (USA)

Inkubátor

IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories (UK)

Magnetická míchačka

KMO 2 basic IKA[®] - WERKE, IKA (Německo)

RW 16 basic IKA[®] (Německo)

Mikrostríkačka

Mikrostríkačka Hamilton 50 μ l, Hamilton (Švýcarsko)

Termoblok

Mini Dry Bath Incubator, Hang Zou Miu Instruments Co., Ltd. (Čína)

Třepačka

ČSAV - vývojové dílny (Československo)

Mini Rocker Shaker MR-1, Biosan (Litva)

Sonikátor

Elmasonic E 30H, ELMA (Německo)

Spektrofotometr

Sunrise Absorbance reader, Tecan (Švýcarsko)

Jednopaprskový spektrofotometr 8453 E, Hewlett Packard (USA)

Vakuová pumpa

Vacusaft, Integra (Švýcarsko)

Váhy

Laboratorní váha KERN 440-35N (Německo)

3.3. Metody

3.3.1. Premedikace potkanů

Expozice experimentálních objektů (potkanů) testovaným sloučeninám byla prováděna v Centru pro experimentální biomodely v Praze v souladu s vyhláškou Ministerstva zemědělství o chovu a využití pokusných zvířat (311/1997). Potkani (♂, kmen Wistar, $\approx 200\text{--}250\text{ g}$) byli chováni ve skupině po dvou jedincích při $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (celkem 6 skupin), s 12 hodinovým denním režimem a s volným přístupem k vodě a potravě. Potkani byli premedikováni příslušnými flavonoidními látkami gaváží do žaludku, po tři dny, dle uvedeného schématu (tab. 2). Flavonoidní látky (popř. jejich kombinace) byly rozpuštěny ve slunečnicovém oleji a podávány v 0,5 ml tak, aby jednorázová dávka odpovídala množství 60 mg/kg hmotnosti potkana. Kontrolní skupina byla premedikována dávkou 0,5 ml slunečnicového oleje. Zvířata byla usmrcena 5. den po 24-hodinovém hladovění. Potkanům byly odebrány: játra, tenké střevo (rozděleno na proximální, střední a distální část) a tlusté střevo. Reprezentativní vzorky jednotlivých tkání byly zmrazeny v kapalném dusíku a dále skladovány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ k dalšímu užití.

Tab. 2: Schéma premedikace potkanů.

	Skupiny					
	Kontrola	BIA	MYR	DHM	MYR + BIA	DHM + BIA
1. den	SO	BIA	MYR	DHM	MYR + BIA	DHM + BIA
2. den	SO	BIA	MYR	DHM	MYR + BIA	DHM + BIA
3. den	SO	BIA	MYR	DHM	MYR + BIA	DHM + BIA
4. den	–					
5. den	usmrcení potkanů					

SO = slunečnicový olej; BIA = biochanin A; MYR = myricetin; DHM = dihydromyricetin; „+“ = látky byly podány společně v jedné dávce

3.3.2. Izolace cytosolárních a mikrosomálních frakcí

Pufr 1: 0,15 M KCl; 0,05 M Tris/HCl; pH 7,4; 50 μ M α -tokoferol v methanolu (přidán ze zásobního roztoku těsně před použitím)

Pufr 2: 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$; pH 7,2

Pufr 3: 0,15 M KCl, 0,05 M Tris/HCl; 20% (v/v) glycerol; pH 7,4

Izolace cytosolárních a mikrosomálních frakcí byla provedena pomocí diferenční centrifugace homogenizovaných preparátů tkání. Izolační proces probíhal ve chlazené místnosti při 4 °C s nástroji vychlazenými na stejnou teplotu.

Zmražené tkáně jater, tenkého střeva a tlustého střeva byly nejprve zváženy a opláchnuty pufr 1. Tkáň byla následně rozstříhána na malé kousky a opláchnuta v pufru 1. Takto připravená tkáň byla poté homogenizována v množství odpovídajícím 4 ml/g, nejprve ve volnějším Potter-Elvehjemově homogenizátoru a posléze v těsnějším uspořádání homogenizátoru. Homogenát byl následně centrifugován 10 minut při 600×g a 4 °C (centrifuga Janetzki K-23, výkyvný rotor 4×70 ml, 2 000 RPM). Supernatanty byly spojeny do nových centrifugačních kyvet o objemu 35 ml a pelety byly znovu rehomogenizovány v pufru 1 v množství odpovídajícím 1 ml/g. Homogenáty byly opět centrifugovány za stejných podmínek. Supernatanty byly smíseny a následně centrifugovány 20 min při 15 000×g a 4 °C (centrifuga Janetzki K-24, úhlový rotor 6×35 ml, 13 500 RPM). Supernatanty byly opatrně odděleny od pelety a dále ultracentrifugovány 65 min při 425 000×g a 4 °C (centrifuga Beckman Coulter Optima LE-80K Ultracentrifuge, rotor Ti 70, 60 000 RPM). Supernatanty představující cytosolární frakce byly alikvotovány do mikrozkušavek Eppendorf, ihned zmraženy kapalným dusíkem a uchovány v mrazícím boxu při -80 °C. Pelety byly resuspendovány v pufru 2 v množství odpovídajícím 2 ml/g a následně homogenizovány v Potter-Elvehjemově homogenizátoru. Homogenát byl ultracentrifugován 90 min při 105 000×g a 4 °C (centrifuga Beckman Coulter Optima XPN-90 Ultracentrifuge, rotor SW 32.1 Ti, 29 000 RPM). Supernatanty byly slity a peletky byly resuspendovány v pufru 3 v množství odpovídající 1/5 hmotnosti původní tkáně. Takto připravené mikrosomální frakce byly alikvotovány do označených mikrozkušavek Eppendorf, ihned zmraženy kapalným dusíkem a uchovány pro další experimentální využití v mrazícím boxu při -80 °C.

3.3.3. Stanovení koncentrace proteinů

Činidlo A: 2% (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$; 0,95% (w/v) NaHCO_3 ; 0,16% (w/v) vinan sodný (w/v); 0,4% (w/v) NaOH , pH 11,25

Činidlo B: 4% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

bicinchoninová kyselina (BCA)

Reakční činidlo: 50 dílů činidla A + jeden díl činidla B + BCA ve finální koncentraci 1% (w/v)

Koncentrace proteinů v mikrosomálních a cytosolárních vzorcích byla stanovena pomocí kitu „Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Kit“, který je založen na metodě podle Wiechelman¹¹⁰. Tato metoda využívá kalorimetrickou detekci modrých měďných komplexů, které vznikají s molekulami bicinchoninové kyseliny, po redukci měďnatých kationtů v přítomnosti proteinů. Komplexy absorbují při 562 nm a absorbance je přímo úměrná koncentraci proteinů ve vzorku.

Kalibrační řada pro stanovení byla připravena ředěním roztoku standardního proteinu BSA „Albumin Standard Ampule“ o koncentraci 2 mg/ml na koncentrace 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 a 0,125 mg/ml. Standardy byly připraveny paralelně v „dubletech“. Mikrosomální a cytosolární vzorky byly naředěny na vhodné koncentrace destilovanou vodou do sterilních mikrozkušavek Eppendorf. Jaterní vzorky byly naředěny 50x a 75x, vzorky tenkého a tlustého střeva 5x a 10x. Z důvodu snahy o eliminaci chyb byl každý vzorek proměřen v „tripletech“.

Standardy a vzorky byly pipetovány na 96-jamkovou titrační destičku v množství 9 μl podle předem připraveného schématu. Jamka „blank“ obsahovala pouze 9 μl destilované vody. Následně bylo do každé jamky přidáno 260 μl čerstvě smíchaného reakčního činidla. Destička byla inkubována 30 min při 37 °C (inkubátor IR 1500 Automatic CO_2). Po inkubaci byla změřena absorbance při 562 nm na čtečce Sunrise Absorbance Reader (Tecan). Data a výsledná koncentrace vzorků byly vyhodnoceny v programu Kim32.

Z důvodu nízké koncentrace některých vzorků byly cytosolární vzorky ze střední a distální části tenkého střeva zakoncentrovány pomocí ultrafiltrační jednotky (Amicon Ultra-15) s hranicí propustnosti 30 kDa. Do horního kompartmentu byly nanесeny 2 ml cytosolu. Takto připravené dva vzorky byly proti sobě vyváženy na předvážkách a umístěny do centrifugy vychlazené na 4 °C (centrifuga Hermle Z 383 K, USA). Vzorky

byly centrifugovány 20 min při 4 000×g. Zakoncentrovaný cytosol o objemu cca 200 µl byl poté mikropipetou přenesen do čisté mikrozkušavky a řádně označen. U zakoncentrovaných vzorků byla následně stanovena koncentrace proteinů dle výše uvedeného postupu a cytosoly byly zamrazeny při -20 °C.

3.3.4. SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Polymerační roztoky: TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit 12 %

Směsi pro přípravu 4 gelů:

Separační gel: 12 ml separačního roztoku A, 12 ml separačního roztoku B, 12 µl TEMED, 80 µl 10% APS

Zaostřovací gel: 4 ml zaostřovacího roztoku A, 4 ml zaostřovacího roztoku B, 8 µl TEMED, 40 µl 10% APS

Elektrodový pufr: 0,192 M glycin; 0,025 M Tris/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3

Vzorkový pufr (4x): 900 µl 4X Laemmli Sample Buffer + 100 µl 2-merkaptoethanolu

Barvicí lázeň: 46% (v/v) EtOH, 9,2% (v/v) CH₃COOH; 0,25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 (CBB)

Odbarvovací lázeň: 25% (v/v) EtOH; 10% (v/v) CH₃COOH

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS) slouží k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Proteinům je udělen během denaturace s SDS záporný náboj, díky kterému migrují v elektrickém poli směrem k anodě podle své molekulové hmotnosti.

K provedení SDS-elektroforézy byl použit elektroforetický systém Mini-PROTEAN® Tetra System (BIO-RAD). Zaostřovací a rozdělovací gely byly připraveny z komerčních roztoků kitu „TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit“ s hustotou zesíťování separačního gelu 12 % a silou gelů 1 mm. Směsi gelů byly navrstveny dle doporučeného návodu a ponechány ke ztuhnutí s 10-jamkovými hřebeny 30-45 min. Po umístění gelů do držáků byl prostor zalit pufrem.

Cytosolární vzorky a standardy sledovaných enzymů byly naředěny destilovanou vodou a poté 4x koncentrovaným vzorkovým pufrem následovně:

- jaterní cytosoly byly naředěny na koncentraci 1 mg/ml (15 µg/jamku)

- zakoncentrované cytosoly tenkého střeva byly naředěny na 7 mg/ml (105 µg/jamku)
- cytosoly tlustého střeva byly naředěny na 3 mg/ml (45 µg/jamku)
- standardy příslušných rekombinantních enzymů SULT (Cypex) byly naředěny na 1 mg/ml (4 µg/jamku)

Vzorky byly následně denaturovány varem v termobloku (Mini Dry Bath Incubator) po dobu 5 min. Takto připravené cytosolární vzorky byly nanесeny do jamek v množství 20 µl Hamiltonovou stříkačkou. Jako standard molekulových hmotností by použit Precision Plus Protein™ Unstained Standard, případně Precision Plus Protein Dual Color Standard (v případě pokračování metodou Western blot, BioRad) v množství 5 µl na jamku.

Držáky s gely byly umístěny do elektroforetické vany s elektrodoým pufrem a připojeny ke zdroji napětí 200 V (PowerPac® Basic, Bio-Rad) po dobu 60-70 min, dokud čelo bromfenolové modři nedosáhlo 2 cm od spodní části gelu.

Po ukončení elektroforézy byla od gelů odříznuta zaostřovací část a gely byly buď použity pro metodu Western blot (viz dále) a nebo obarveny v barvicí lázni CBB po dobu jedné hodiny a poté odbarveny po dobu alespoň 3 hodin v odbarvovací lázni.

3.3.5. Western blot

Přenosový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycine; pH 8,3

PBS Triton X-100: 0,134 M NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 0,3% (w/v) Triton X-100; pH 7,2

Blokovací roztok: 5% roztok sušeného odtučněného mléka v PBS Triton X-100

Vyvolávací roztok: BCIP/NBT substrát pro alkalickou fosfatasy:

10 ml reakčního pufru (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1mM MgCl₂; pH 9,0)

66 µl roztoku nitrotetrazoliové modři (NBT; 50 mg/ml)

33 µl roztoku 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfátu (BCIP; 50 mg/ml)

Western blot je imunodetekční technika, která zde slouží k detekci specifických proteinů, přenesených z polyakrylamidového gelu, na kterém byly rozděleny. Vizualizace studovaných proteinů zde probíhá pomocí enzymu alkalické fosfatasy, konjugované se

sekundární protilátkou, která katalyzuje přeměnu substrátu na fialový produkt, značící přítomnost sledovaných proteinů.

Gel byl nejprve inkubován v přenosovém pufru, který obsahoval 10% methanol, po dobu 20 min. Mezitím byly nastříhány nitrocelulosové membrány dle rozměrů gelu. Postupně byly smočeny v elektrodovém pufru, následně krátce v destilované vodě a poté ponechány alespoň 5 minut v přenosovém pufru.

Na spodní desku (anodu) blotovacího systému Trans-Blot[®] Turbo[™] Blotting System byly položeny tři kusy papíru Whatman č. 3, důkladně smočené v přenosovém pufru. Následně na ně byla umístěna smočená membrána, která byla překryta polyakrylamidovým gelem. Celé uspořádání bylo překryto třemi kusy papíru Whatman č. 3, smočenými v přenosovém pufru. Kazeta byla uzavřena svrchní deskou, katodou, a umístěna do přístroje. Blotovací program probíhal 7 min při 25 V. Poté byly membrány umístěny na 1 hodinu při 4 °C do blokovacího roztoku, aby se předešlo nespecifickým interakcím membrány s primární protilátkou.

Po blokování byly membrány inkubovány s primární anti-proteinovou (anti-peptidovou) protilátkou proti SULT1A1, naředěnou v blokovacím roztoku 1:400 (v případě anti-proteinové) a 1 µg/ml. Membrány byly inkubovány 2 hodiny při 6 °C za stálého míchání na třepačce.

Po uplynutí doby inkubace byly membrány vyvolány pomocí systému SNAP i.d[®] Protein Detection. Membrány byly 3x promyty 15 ml PBS Triton-X 100 roztokem a poté inkubovány se sekundární kozí protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfátasou (1:1429) po dobu 10 min. Následně byly membrány opět promyty PBS Triton-X 100 (3x15 ml), vyjmuty a umístěny do destilované vody.

Vyvolání membrány bylo provedeno pomocí vyvolávacího roztoku se substrátem pro alkalickou fosfátasu, který byl připraven čerstvý pro okamžité použití. Membrány v něm byly ponechány 15-30 min, dokud nedošlo k vizualizaci příslušných proužků. Po vyvolání byly membrány omyty destilovanou vodou a vysušeny na filtračním papíru.

3.3.6. Stanovení aktivity SULT1A1 v cytosolárních vzorcích

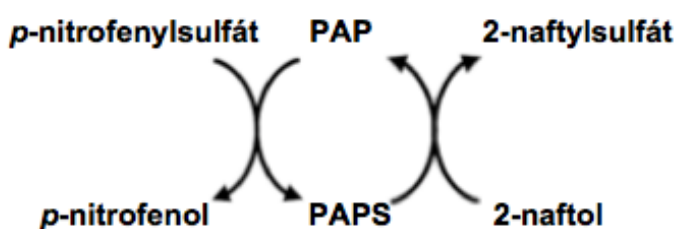
Pufr: 50 mM fosfátový pufr obsahující 50 mM MgCl₂; pH 6,5

Reagencie: 2 mM 3'-fosfoadenosin-5-fosfosulfát (PAPS)

50 mM *p*-nitrofenylsulfát (pNPS) v H₂O

10 mM 2-naftol v ethanolu

Stanovení aktivity enzymu SULT1A1 v cytosolárních vzorcích bylo převzato a optimalizováno dle metody podle Frame a kol.¹¹¹. Metoda je založena na měření kinetiky spřažené reakce, která probíhá za katalýzy SULT1A1 (obr. 6). S probíhající reakcí vzniká z jedné z výchozích látek *p*-nitrofenylsulfátu (pNPS), žlutě zbarvený produkt *p*-nitrofenol, který absorbuje při vlnové délce 405 nm a jehož koncentrace je přímo úměrná enzymové aktivitě. Z rozdílu absorbancí reakční směsi v čase t_0 a t_{10} se pak následně určí aktivita enzymu v příslušném vzorku.



Obr. 6: Schéma principu spřažené reakce stanovení aktivity enzymu SULT1A1.

Pro stanovení byly připravovány reakční směsi o objemu 1 ml. Množství cytosolárních proteinů v reakční směsi odpovídalo rozmezí 0,1-0,5 mg/ml. Všechny reagencie byly smíchány v kyvetě tak, aby bylo dosaženo optimálních koncentrací reakčních složek: 5 mM MgCl₂, 20 μM PAPS, 5 mM pNPS a 100 μM 2-naftol. Každý vzorek byl vždy měřen oproti „blanku“ (reakční směs bez cytosolu) a byla k němu provedena negativní kontrola. Reakce byla iniciována přidavkem 10 μl jaterního cytosolu, resp. 300 μl cytosolu ze střev. Po ustálení systému (20 s) byla měřena absorbance reakční směsi při vlnové délce 405 nm po dobu 10 minut (Spektrofotometr 8453 E, Hewlett Packard). Koncentrace *p*-nitrofenolu ve směsi byla stanovena na základě naměřených

absorbancí za pomoci molárního extinkčního koeficientu pro *p*-nitrofenol $18\,200\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ¹¹².

Specifická aktivita enzymu (*a*) v reakci byla vypočtena dle vzorce na obr. 7 a vyjádřena jako počet pmol substrátu přeměněných za jednu minutu jedním miligramem proteinu (pmol/min/mg). Aktivita SULT1A1 byla pro každý cytosolární vzorek měřena třikrát. Výsledná aktivita je průměr ze tří měření.

$$a = \frac{\Delta A_{0-10}}{\varepsilon \cdot l \cdot c \cdot t}$$

Obr. 7: Vzorec pro výpočet aktivity (*a*) enzymu SULT1A1.

ΔA = rozdíl absorbancí v čase t_0 a t_{10} ; ε = extinkční koeficient pro *p*-nitrofenol; l = délka kyvety (zde 1 cm); c = koncentrace proteinů v cytosolu v mg/ml; t = čas (zde 10 min)

3.3.7. Inhibice aktivity SULT1A1 působením flavonoidních látek

Inhibiční efekt vybraných flavonoidních látek byl stanoven na základě modifikované metody popsané v kapitole 3.3.6. Jako referenční inhibitor zde byl navíc použit flavonoid kvercetin.

Z důvodu citlivosti stanovení byla metoda převedena na destičkové, 96-jamkové uspořádání, a objem reakční směsi byl snížen na 200 μl . Pro stanovení inhibičního potenciálu flavonoidních látek byl použit rekombinantní enzym SULT1A1*2 v optimalizovaném množství 3,3 μg /reakci, které bylo stanoveno na základě lineární závislosti. Koncentrace reakčních sloučenin ve směsi odpovídala koncentracím při stanovení aktivit v cytosolárních vzorcích: 5 mM pNPS, 100 μM 2-naftol a 20 μM PAPS. Všechny flavonoidní látky byly rozpuštěny v methanolu a byly připraveny ředící řadou ve čtyřech koncentracích 1; 5; 10; 20 μM . Pro každou koncentraci inhibitoru byla stanovena aktivita SULT1A1. Každý vzorek s obsahem flavonoidní látky byl stanoven v „dubletu“ a zároveň byl k němu stanoven odpovídající vzorek bez inhibitoru, taktéž v „dubletu“. Ke každému stanovení náležel „slepý“ vzorek (čistý pufr) a negativní kontrola (reakční směs bez pNPS). Reakce byly iniciovány přidáním 10 mM 2-naftolu. Absorbance byla měřena za laboratorní teploty po dobu 10 min s intervalem měření jedné minuty (Spektrofotometr Tecan). Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafů závislosti absorbance na čase a ze směrnice byla určena reakční rychlost katalyzované reakce.

4. VÝSLEDKY

4.1. Izolace buněčných frakcí a stanovení koncentrace proteinů

Ze tří typů odebraných orgánů premedikovaných potkanů – jater, tenkého střeva a tlustého střeva byly izolovány cytosolární a mikrosomální frakce dle postupu uvedeného v kap. 3.3.2. Tenké střevo bylo navíc rozděleno na proximální, střední a distální část. Kontrolním potkanům byl podáván pouze slunečnicový olej. V izolovaných vzorcích byla následně stanovena koncentrace proteinů. Charakteristiky mikrosomálních a cytosolárních preparátů z tkání jednotlivých orgánů jsou uvedeny v tabulkách 3-5, str. 45 a 46.

Tab. 3: Charakterizace získaných frakcí z tenkého střeva premedikovaných potkanů flavonoidními látkami.

Premedikace	Část tenkého střeva	Hmotnost tkáně [g]	Koncentrace proteinů v cytosolu [mg/ml]	Koncentrace proteinů v mikrosomech [mg/ml]
Kontrola	P	3,3	3,6	2,2
	M	3,3	5,5	2,8
	D	2,3	4,6	2,1
Biochanin A	P	3,0	4,2	3,2
	M	2,5	5,7	3,7
	D	2,4	4,7	2,7
Myricetin	P	2,1	1,9	0,9
	M	2,3	4,4	2,6
	D	2,5	4,5	2,4
Dihydromyricetin	P	2,7	2,3	4,6
	M	2,5	5,8	3,8
	D	1,7	3,9	2,1
Biochanin A + myricetin	P	2,6	3,7	2,8
	M	2,5	5,0	2,3
	D	2,5	5,4	3,2
Biochanin A + dihydromyricetin	P	2,8	2,7	1,1
	M	2,6	5,3	2,9
	D	3,1	5,6	2,4

P – proximální část, S – střední část, D – distální část

Tab. 4: Charakterizace získaných frakcí z jater premedikovaných potkanů flavonoidními látkami.

Premedikace	Hmotnost tkáně [g]	Koncentrace proteinů v <i>cytosolu</i> [mg/ml]	Koncentrace proteinů v <i>mikrosomech</i> [mg/ml]
Kontrola	15,8	30,1	20,5
Biochanin A	15,4	21,9	20,1
Myricetin	16,2	26,2	41,6
Dihydromyricetin	18,0	22,8	36,8
Biochanin A + myricetin	17,3	22,9	32,7
Biochanin A + dihydromyricetin	17,0	25,7	34,6

Tab. 5: Charakterizace získaných frakcí z tlustého střeva premedikovaných potkanů flavonoidními látkami.

Premedikace	Hmotnost tkáně [g]	Koncentrace proteinů v <i>cytosolu</i> [mg/ml]	Koncentrace proteinů v <i>mikrosomech</i> [mg/ml]
Kontrola	3,2	3,4	4,0
Biochanin A	2,2	3,2	3,6
Myricetin	2,5	3,5	3,9
Dihydromyricetin	2,3	3,1	2,3
Biochanin A + myricetin	2,3	3,0	4,1
Biochanin A + dihydromyricetin	2,9	3,6	4,6

Z důvodu velmi nízké koncentrace cytosolů tenkého střeva (střední a distální část) byly tyto vzorky pro další použití 10x zakoncentrovány a opět stanoveny na koncentraci proteinů (tab. 6, str. 47). Takto připravené cytosoly o objemu zhruba 200 µl byly dále použity pro sledování efektu flavonoidních látek na SULT1A1 pomocí metody Western blot.

Tab. 6: Charakterizace zakoncentrovaných cytosolárních frakcí střední a distální části tenkého střeva.

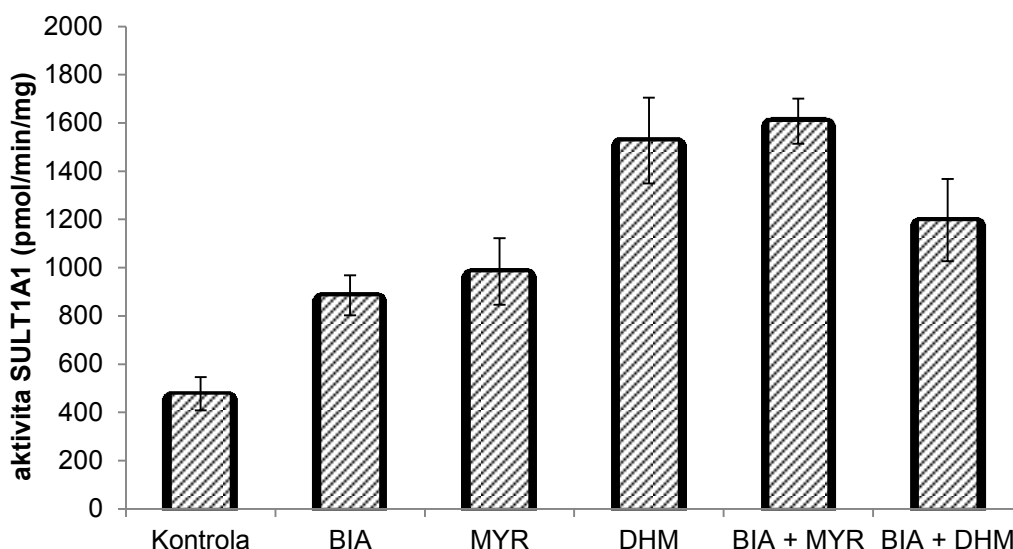
Premedikace	Část tenkého střeva	Koncentrace proteinů v cytosolu [mg/ml]
Kontrola	S	33,1
	D	30,6
Biochanin A	S	30,9
	D	27,2
Myricetin	S	27,6
	D	33,7
Dihydromyricetin	S	19,6
	D	24,4
Biochanin A + myricetin	S	25,4
	D	28,4
Biochanin A + dihydromyricetin	S	28,2
	D	27,5

S – střední část, D – distální část

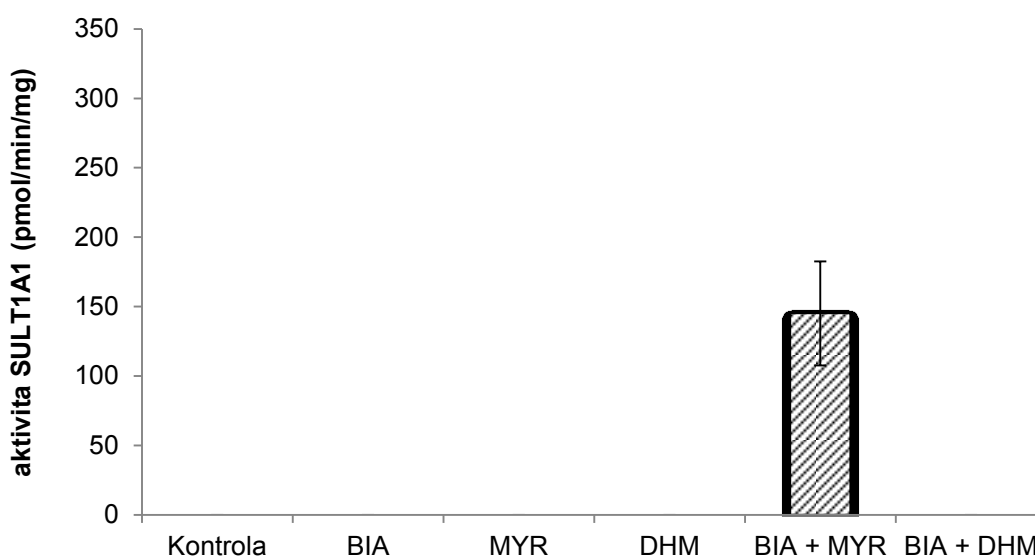
4.2. Stanovení aktivity SULT1A1 v cytosolárních vzorcích

Vliv flavonoidních látek myricetinu, dihydromyricetinu a biochaninu A na expresi enzymu SULT1A1 byl sledován v cytosolárních vzorcích jater a střev nejprve na úrovni aktivity enzymu. Metoda stanovení je založena na spřažené reakci dvou substrátů SULT1A1 *p*-nitrofenylsulfátu (pNPS) a 2-naftolu. Z výchozí látky pNPS vzniká enzymově katalyzovanou reakcí žlutě zbarvený produkt *p*-nitrofenol, jehož koncentrace je přímo úměrná aktivitě enzymu.

V jaterní tkáni způsobila premedikace flavonoidními látkami v porovnání s kontrolou nárůst aktivity u všech vzorků (obr. 8, str. 48). Podání dihydromyricetinu zvýšilo aktivitu SULT1A1 více jak 3x. Při podání dvou sloučenin současně měla kombinace myricetin + biochanin A významnější modulační efekt (viz obr. 8, str. 48).



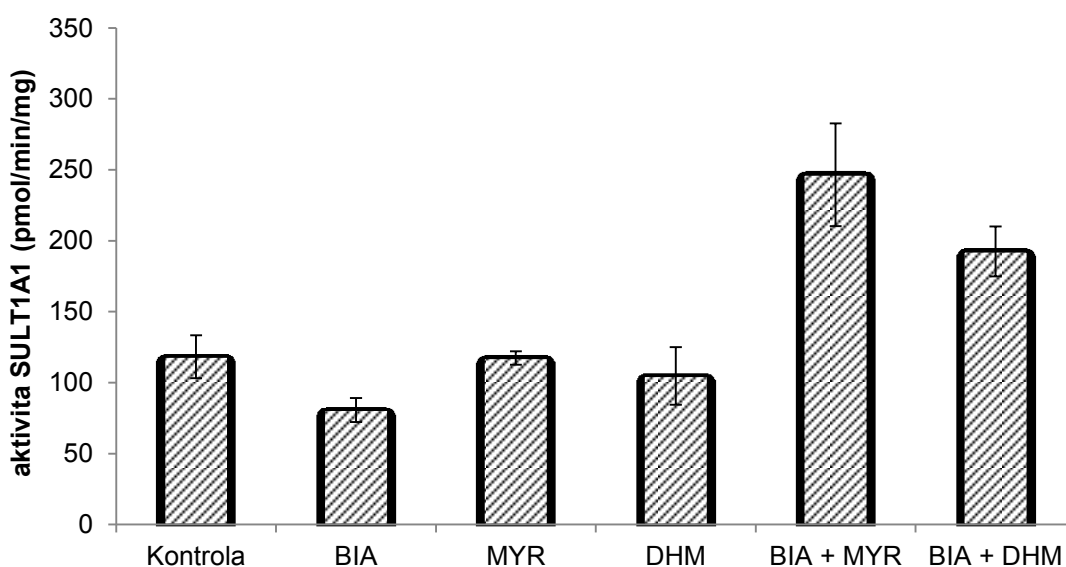
Obr. 8: Vliv flavonoidních látek na aktivitu SULT1A1 v cytosolárních vzorcích jater. Graf znázorňuje průměrnou hodnotu aktivity SULT1A1 ze tří měření s odpovídajícími směrodatnými odchylkami.
BIA - biochanin A; MYR - myricetin, DHM - dihydromyricetin, „+“ - současné podání



Obr. 9: Vliv flavonoidních látek na aktivitu SULT1A1 v cytosolárních vzorcích proximální části tenkého střeva. Graf znázorňuje průměrnou hodnotu aktivity SULT1A1 ze tří měření s odpovídajícími směrodatnými odchylkami.
BIA - biochanin A; MYR - myricetin, DHM - dihydromyricetin, „+“ - současné podání

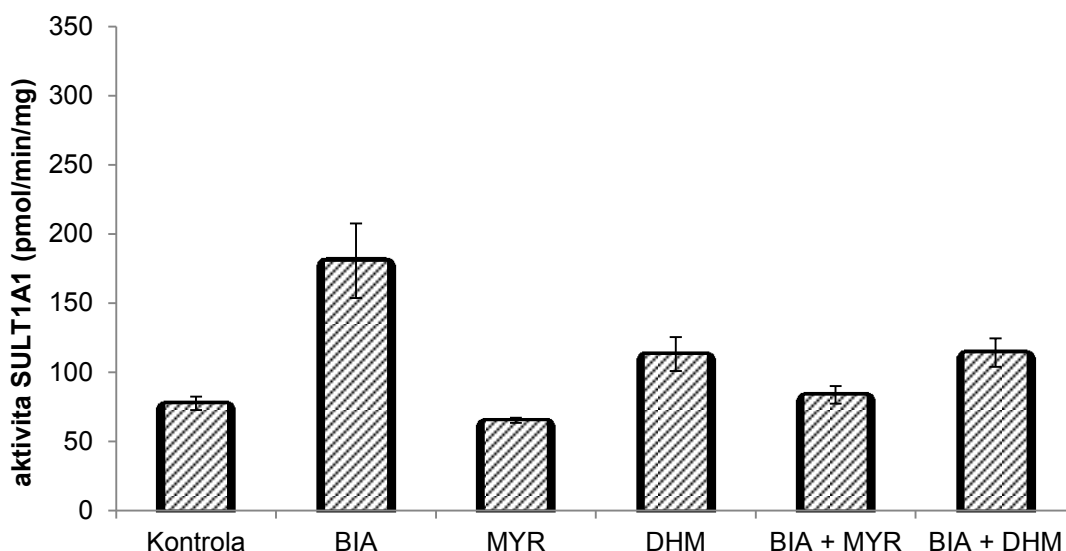
Na obrázcích 9 (str. 48), 10 a 11 (str. 50) jsou znázorněny naměřené aktivity SULT1A1 v proximální, střední a distální části tenkého střeva. Nejvyšší nárůst aktivity byl zpozorován po premedikaci biochaninem A spolu s myricetinem. Toto současné podání způsobilo ve střední části tenkého střeva téměř dvojnásobný nárůst aktivity oproti kontrolní premedikaci. V proximální části tenkého střeva se podařilo naměřit aktivitu pouze v cytosolu po premedikaci biochaninem A a myricetinem. Ostatní cytosoly nevykazovaly žádnou aktivitu SULT1A1. V distální části tenkého střeva způsobilo téměř dvojnásobný nárůst aktivity podání samotného biochaninu A.

Také ve tkáni tlustého střeva způsobilo podání biochaninu A významný nárůst aktivity oproti kontrole (obr. 12, str. 50). Myricetin naopak způsobil neobvyklý pokles aktivity SULT1A1.



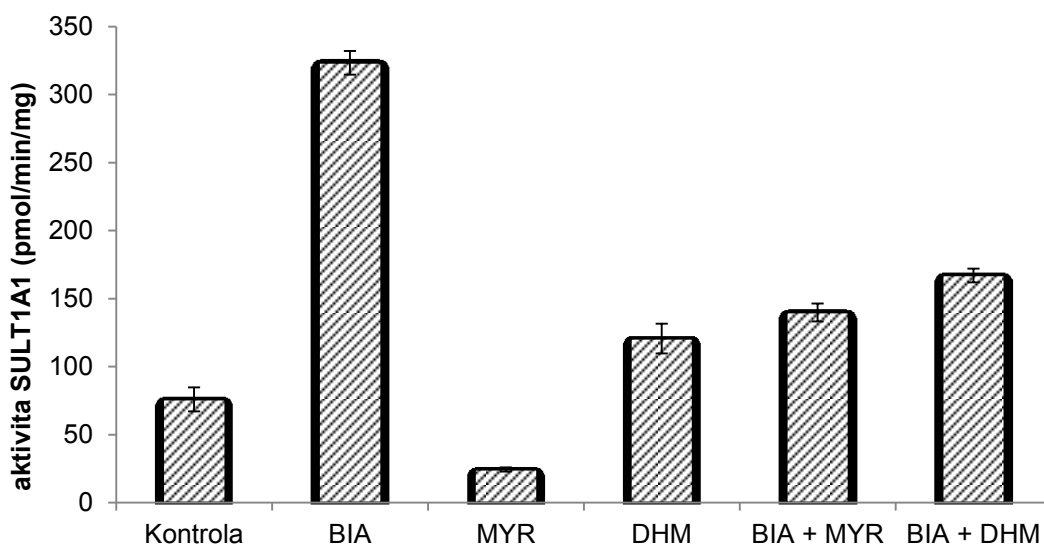
Obr. 10: Vliv flavonoidních látek na aktivitu SULT1A1 v cytosolárních vzorcích střední části tenkého střeva. Graf znázorňuje průměrnou hodnotu aktivity ze tří měření s odpovídajícími směrodatnými odchylkami.

BIA - biochanin A; MYR - myricetin, DHM - dihydromyricetin, „+“ - současné podání



Obr. 11: Vliv flavonoidních látek na aktivitu SULT1A1 v cytosolárních vzorcích distální části tenkého střeva. Graf znázorňuje průměrnou hodnotu aktivity ze tří měření s odpovídajícími směrodatnými odchylkami.

BIA - biochanin A; MYR - myricetin, DHM - dihydromyricetin, „+“ - současné podání



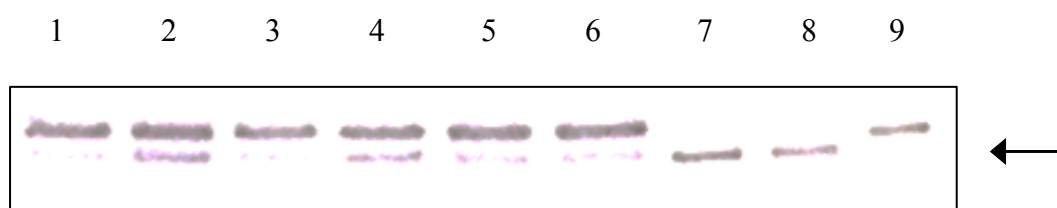
Obr. 12: Vliv flavonoidních látek na aktivitu SULT1A1 v cytosolárních vzorcích tlustého střeva. Graf znázorňuje průměrnou hodnotu aktivity ze tří měření s odpovídajícími směrodatnými odchylkami.

BIA - biochanin A; MYR - myricetin, DHM - dihydromyricetin, „+“ - současné podání

4.3. Stanovení exprese SULT1A1 po premedikaci flavonoidními sloučeninami

Vliv podání vybraných flavonoidních látek na expresi sulfotransferasy SULT1A1 byl studován také pomocí metody Western blot. V játrech a střevech potkanů, tedy hlavních detoxikačních orgánech, byl zkoumán jejich indukční efekt. Potkanům byly po tři dny podávány gaváží do žaludku studované flavonoidní látky (60 mg/kg) – myricetin, dihydromyricetin a biochanin A. Dvěma skupinám byly též podávány kombinace těchto látek – myricetin/dihydromyricetin + biochanin A. Kontrolním potkanům byl podáván pouze slunečnicový olej.

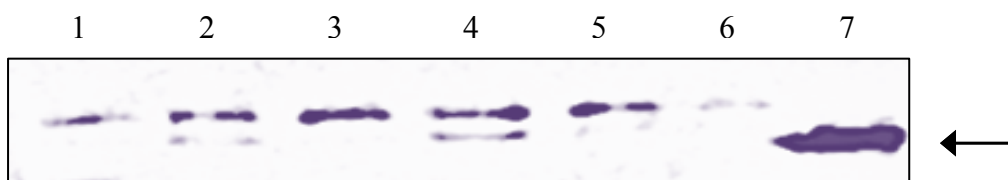
K imunodetekci byla jako první použita komerční protilátka proti nativnímu proteinu SULT1A1. Jako standardy byly použity lidské, rekombinantní enzymy SULT1A1, SULT1B1 a SULT1C2. Z obr. 13 je patrné, že podání biochaninu A a dihydromyricetinu způsobilo indukci SULT1A1 ve tkáni jater v porovnání s kontrolní premedikací. Kombinované podání flavonoidních látek indukovalo enzym SULT1A1 velmi slabě. Původ horního vyvolaného proužku je neznámý. Pro přesnější detekci byla následně použita anti-peptidová protilátka, která poskytla slabší vizualizaci, ale stejné výsledky (obr. 14, str. 52).



Obr. 13: Vliv flavonoidních látek na indukci SULT1A1 v játrech.

Elektroforeticky rozdělené cytosolární vzorky jater (15 µg/jamka) byly přeneseny na membránu a vyvolány primární králičí protilátkou proti proteinu SULT1A1. Šipkou je označena poloha SULT1A1 (≈ 34 kDa)

Rozložení vzorků: 1 - kontrola, 2 - biochanin A, 3 - myricetin, 4 - dihydromyricetin, 5 - biochanin A + myricetin, 6 - biochanin A + dihydromyricetin, 7 - lidský rekombinantní SULT1A1, 8 - lidský rekombinantní SULT1B1, 9 - lidský rekombinantní SULT1C2



Obr. 14: Vliv flavonoidních látek na indukci SULT1A1 v játrech.

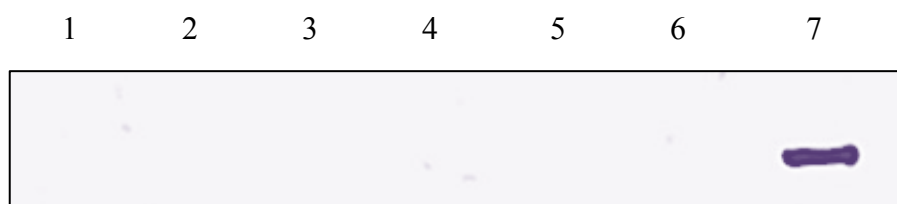
Elektroforeticky rozdělené cytosolární vzorky jater (15 µg/jamka) byly přeneseny na membránu a vyvolány primární králičí protilátkou proti peptidu SULT1A1. Šipkou je označena poloha SULT1A1 (≈ 34 kDa)

Rozložení vzorků: 1 - kontrola, 2 - biochanin A, 3 - myricetin, 4 - dihydromyricetin, 5 - biochanin A + myricetin, 6 biochanin A + dihydromyricetin, 7 - lidský rekombinantní SULT1A1

V proximální části tenkého střeva (obr. 15) nedošlo k žádné indukci SULT1A1. Obarvený gel na detekci proteinů z elektroforetického dělení proteinů potvrdil neobvyklou distribuci proteinových zón (nezobrazeno).

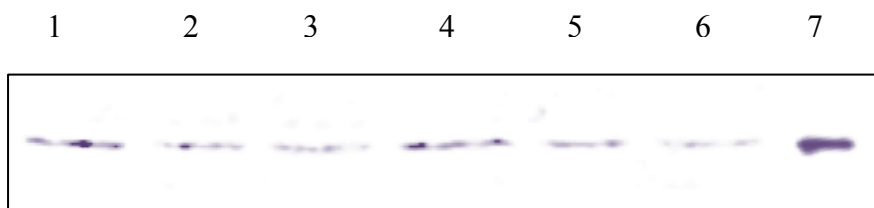
Vzhledem k velmi nízkým koncentracím pod mez detekce proteinů v tenkém střevě byla koncentrace proteinů ve vzorcích střední a distální části střev pro účely imunodetekce zvýšena 7x, což poskytlo dostatečné množství pro zobrazení. Z obr. 16 a 17 (str. 53) je patrné, že ve střední a distální části došlo ke srovnatelné expresi SULT1A1 po premedikaci flavonoidy v porovnání s kontrolním cytosolem. Enzym SULT1A1 se ve tkáni exprimoval bez ohledu na premedikaci flavonoidními látkami.

V tlustém střevě nedošlo k indukci SULT1A1 (obr. 18, str. 53).



Obr. 15: Vliv flavonoidních látek na indukci SULT1A1 ve proximální části tenkého střeva. Elektroforeticky rozdělené cytosolární vzorky tenkého střeva (30 µg/jamka) byly přeneseny na membránu a vyvolány primární králičí protilátkou proti peptidu SULT1A1.

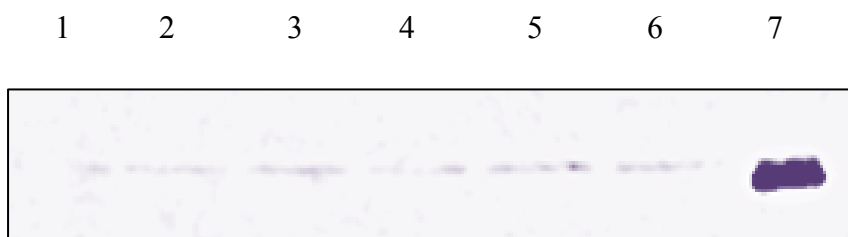
Rozložení vzorků: 1 - kontrola, 2 - biochanin A, 3 - myricetin, 4 - dihydromyricetin, 5 - biochanin A + myricetin, 6 - biochanin A + dihydromyricetin, 7 - lidský rekombinantní SULT1A1



Obr. 16: Vliv flavonoidních látek na indukci SULT1A1 ve střední části tenkého střeva.

Zakoncentrované a elektroforeticky rozdělené cytosolární vzorky tenkého střeva (105 µg/jamka) byly přeneseny na membránu a vyvolány primární králičí protilátkou proti peptidu SULT1A1.

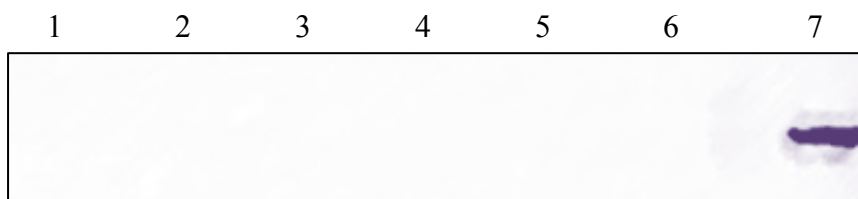
Rozložení vzorků: 1 - kontrola, 2 - biochanin A, 3 - myricetin, 4 - dihydromyricetin, 5 - biochanin A + myricetin, 6 - biochanin A + dihydromyricetin, 7 - lidský rekombinantní SULT1A1



Obr. 17: Vliv flavonoidních látek na indukci SULT1A1 v distální části tenkého střeva.

Zakoncentrované a elektroforeticky rozdělené cytosolární vzorky tenkého střeva (105 µg/jamka) byly přeneseny na membránu a vyvolány primární králičí protilátkou proti peptidu SULT1A1.

Rozložení vzorků: 1 - kontrola, 2 - biochanin A, 3 - myricetin, 4 - dihydromyricetin, 5 - biochanin A + myricetin, 6 - biochanin A + dihydromyricetin, 7 - lidský rekombinantní SULT1A1



Obr. 18: Vliv flavonoidních látek na indukci SULT1A1 v tlustém střevě.

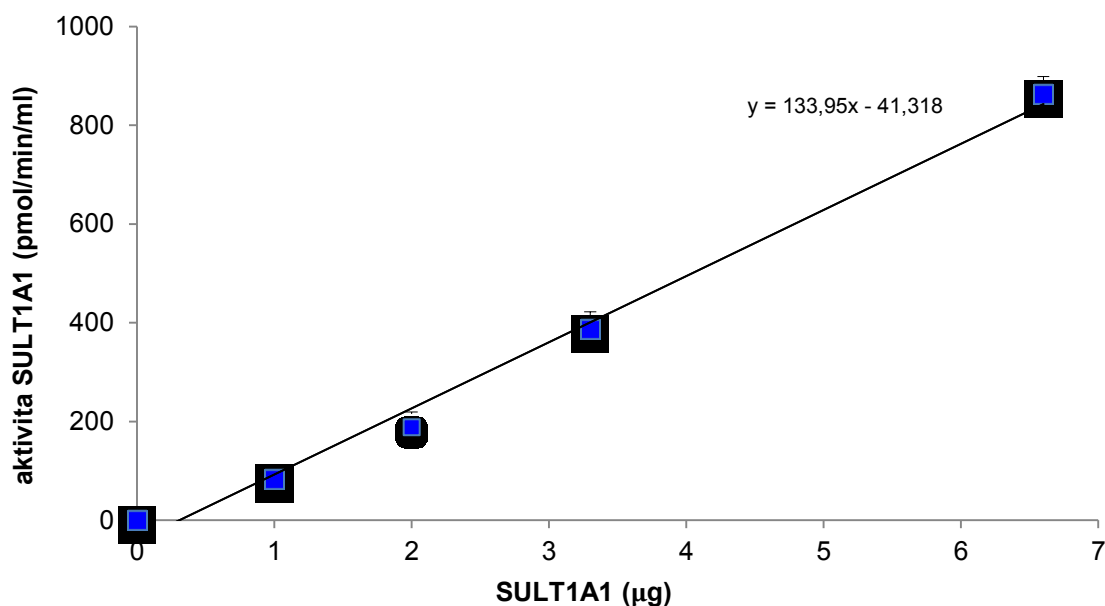
Elektroforeticky rozdělené cytosolární vzorky tlustého střeva (45 µg/jamka) byly přeneseny na membránu a vyvolány primární králičí protilátkou proti peptidu SULT1A1.

Rozložení vzorků: 1 - kontrola, 2 - biochanin A, 3 - myricetin, 4 - dihydromyricetin, 5 - biochanin A + myricetin, 6 - biochanin A + dihydromyricetin, 7 - lidský rekombinantní SULT1A1

4.4. Inhibiční účinky flavonoidních látek na aktivitu SULT1A1

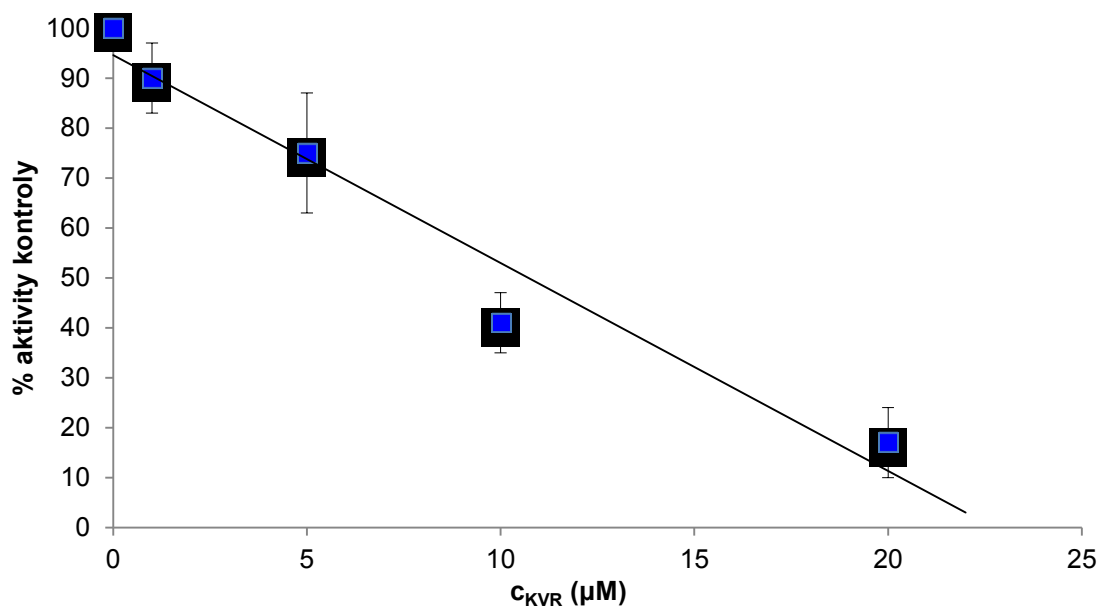
Vedle studia vlivu flavonoidních látek na SULT1A1 *in vivo* byl zkoumán i inhibiční efekt jednotlivých flavonoidů na lidský rekombinantní enzym hSULT1A1 *in vitro*. Spolu s myricetinem a dihydromyricetinem byl do studie zařazen i prokázaný inhibitor SULT1A1, flavonoid kvercetin. Pro stanovení inhibičního potenciálu byla použita modifikovaná metoda na principu stanovení uvedeného v kap. 3.3.6., která využívá fotometrické detekce vznikajícího produktu *p*-nitrofenolu. Pro určení optimálního množství rekombinantního enzymu v reakční směsi byla měřena závislost absorbance, resp. přepočtené aktivity enzymu, na množství enzymu v reakci (obr. 19, str. 55). Jako optimální i vzhledem k dostupnému zásobnímu roztoku bylo stanoveno množství 3,3 µg/200 µl reakční směsi, které bylo i zároveň dostatečné pro lineární průběh reakce po dobu deseti minut. Pro určení aktivity SULT1A1 v reakční směsi s flavonoidy byla měřena absorbance po dobu 10 min a následně porovnána s kontrolním měřením bez flavonoidu.

Z testovaných flavonoidních sloučenin vykazoval inhibiční efekt na SULT1A1 pouze referenční flavonoid kvercetin u kterého byla stanovena hodnota $IC_{50} = 10,7 \mu M$ (obr. 20, str. 55). Myricetin, dihydromyricetin ani biochanin A nezpůsobily významný pokles aktivity rekombinantního enzymu SULT1A1 oproti kontrolním měřením bez flavonoidů (viz. tab. 7, str. 56).



Obr. 19: Závislost aktivity SULT1A1 na množství proteinu v reakci.

Z grafu vyplývá, že aktivita enzymu je přímo úměrná množství proteinu v reakci a jako optimální pro reakční směs se jeví 3,3 μg. Reakční směs obsahovala 5 mM pNPS, 100 μM 2-naftol a 20 μM PAPS. Data jsou průměrem dvou měření s vyznačenou směrodatnou odchylkou.



Obr. 20: Inhibice aktivity SULT1A1 kvercetinem (KVR).

Míra inhibice je vyjádřena jako % aktivity kontrolní reakce bez flavonoidu (= 100 %) pro jednotlivé koncentrace KVR v reakční směsi. Reakční směs obsahovala 5 mM pNPS, 100 μM 2-naftol a 20 μM PAPS. Data jsou průměrem dvou měření s vyznačenou směrodatnou odchylkou.

Tab. 7: Vyjádření inhibičního potenciálu flavonoidů.

A

Flavonoid	c_F [μM]	v
Myricetin	1	0,027
	5	0,017
	10	0,023
	20	0,024
$v_{\text{kon}} = 0,025$		

B

Flavonoid	c_F [μM]	v
Dihydromyricetin	1	0,024
	5	0,026
	10	0,021
	20	0,026
$v_{\text{kon}} = 0,031$		

C

Flavonoid	c_F [μM]	v
Biochanin A	1	0,029
	5	0,031
	10	0,033
	20	0,026
$v_{\text{kon}} = 0,032$		

Srovnání reakční rychlosti reakce (v) s přidávanými flavonoidy o různých koncentracích myricetinem (A), dihydromyricetinem (B) a biochaninem A (C) s reakční rychlostí reakce bez přidaného flavonoidu (v_{kon}). Počáteční rychlost reakce byla stanovena ze směrnice lineární závislosti růstu absorbance vznikajícího produktu *p*-nitrofenolu v čase. Z uvedených hodnot vyplývá, že žádný flavonoid neinhiboval aktivitu SULT1A1.

Reakční směs obsahovala 5 mM pNPS, 100 μM 2-naftol a 20 μM PAPS. Uvedené hodnoty jsou průměrem dat ze dvou měření.

c_F = koncentrace flavonoidu v reakční směsi; v = reakční rychlost reakce; v_{kon} = reakční rychlost kontrolní reakce bez flavonoidu

5. DISKUZE

Řada přírodních rostlinných látek má chemopreventivní a zdraví prospěšné účinky, čehož bylo využíváno v tradičním lidovém léčitelství či přístupech ke zdraví jako je ajurvěda či tradiční čínská medicína. Moderní technologie umožnila tyto přirozeně se vyskytující látky identifikovat a koncentrovat do formy doplňků stravy. Obliba a dostupnost těchto preparátů neustále roste. Vědecké výzkumy se převážně soustřeďují na dokumentaci jejich pozitivních účinků, zejména z hlediska chemoprevence a antioxidačního působení na organismus. Zároveň je ale potřeba uvažovat možné negativní dopady těchto sloučenin, které jsou cizorodými látkami. Vysoké dávky fytochemikálií, které jsou prostřednictvím doplňků stravy konzumovány, mohou ovlivnit endogenní metabolismus a též i aktivitu enzymů I. a II. fáze biotransformace xenobiotik, které jsou důležité pro bezpečnou detoxikaci biologicky aktivních látek přijímaných z vnějšího prostředí. Některé biotransformační enzymy mohou vedle detoxikace metabolicky aktivovat prokarcinogenní sloučeniny. Mezi tyto enzymy II. fáze biotransformace patří cytosolární sulfotransferasy (SULT), konkrétně SULT1A1, 1A2, 1B1 nebo 1C2. Flavonoidní látky mohou tedy prostřednictvím indukce či inhibice aktivity těchto enzymů naopak podpořit toxické a karcinogenní procesy a tím potencovat proces karcinogeneze⁵⁸.

V této rigorózní práci byl zkoumán vliv vybraných přírodních látek ze skupiny flavonoidů myricetinu (MYR) a dihydromyricetinu (DHM) na expresi a aktivitu enzymu majoritní sulfotransferasy SULT1A1. Flavonoid DHM se dostal do povědomí ve spojitosti s léčbou závislosti na alkoholu a zmírňování nežádoucích účinků konzumace alkoholu⁹³. Ve Spojených státech amerických je DHM komerčně dostupný v podobě doplňků stravy, jako účinný preparát, který má preventivně působit proti kocovině. Mechanismus účinku tohoto flavonoidu na „maskování“ intoxikace ethanolem stále nebyl jednoznačně identifikován. Nelze ani vyloučit případné nežádoucí účinky tohoto flavonoidu.

Myricetin je strukturně DHM velmi podobný (liší se pouze přítomností dvojné vazby), na rozdíl od něj se však vyskytuje v široké škále rostlin a plodů běžně se vyskytujících v lidské stravě. Z toho důvodu je zajímavé sledovat případnou korelaci v modulačních efektech na SULT1A1. Jako referenční flavonoidní látka byl do studie dále zahrnut biochanin A (BIA), u kterého byla popsána schopnost indukovat SULT1A1⁸⁵ a kvercetin (KVR), který je naopak silným inhibitorem aktivity SULT1A1¹¹³.

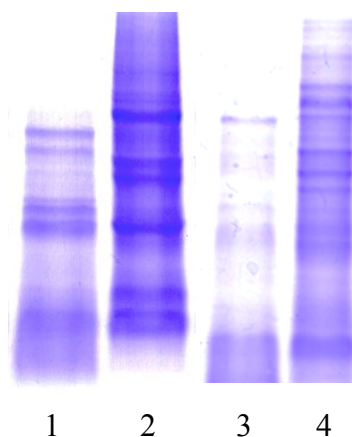
Vliv flavonoidních látek na SULT1A1 byl sledován na třech úrovních. V cytosolárních vzorcích získaných z premedikovaných potkanů byl nejprve sledován efekt podaných flavonoidů na aktivitu SULT1A1. Současně byla ve vzorcích určena exprese SULT1A1 prostřednictvím imunodetekce. S použitím lidského rekombinantního enzymu v podmínkách *in vitro* byla proměřena případná inhibice aktivity SULT1A1 flavonoidními látkami. Enzym SULT1A1 je nejdéle studovaná sulfotransferasa, ale i tak oproti jiným biotransformačním enzymům zatím nebyly její možné interakce s flavonoidními látkami rozsáhleji charakterizovány. Byla provedena řada studií, zkoumajících efekty flavonoidních látek na aktivitu a expresi SULT1A1 pomocí RT-PCR metody. Například isoflavon genistein indukoval hSULT1A1 v buněčných liniích Caco-2 a Hep G2⁸⁷. Syntetický flavonoid β -naftoflavon se strukturou podobnou flavonům taktéž indukoval hSULT1A1 *ex vivo*¹¹⁴. Jen málo studií se soustřeďuje na charakterizaci těchto efektů v podmínkách *in vivo*. Z toho důvodu se tato práce zaměřuje na studium modulačních účinků flavonoidů na potkaních modelech. Studované vzorky byly izolovány z hlavních orgánů metabolismu xenobiotik – jater a střev, potkanům premedikovaných testovanými flavonoidy. Z důvodu přiblížení se expozici látek u člověka byly potkanům podávány flavonoidy gaváží do žaludku.

Nejprve byla sledována aktivita SULT1A1 v cytosolárních vzorcích po premedikaci flavonoidy myricetinem (MYR), dihydromyricetinem (DHM) a biochaninem A (BIA). Nejvýraznější efekt byl zaznamenán v jaterní tkáni, kde podání DHM zvýšilo aktivitu SULT1A1 oproti kontrolní premedikaci více jak 3x. Naopak ve střevech tento flavonoid nezpůsobil žádnou výraznou změnu v aktivitě enzymu. BIA, prokázaný induktor SULT1A1, způsobil nárůst aktivity SULT1A1 v jaterní tkáni a tkáni tlustého střeva, zatímco v tenkém střevě pouze v distální části. Zvýšená aktivita může být spojena s vlastním metabolismem flavonoidu, který je v rámci biotransformace sulfatován a následně exkretován z organismu¹⁰⁶. Flavonoidní látky byly podány také současně, za účelem studie potenciálních synergických efektů. Podání kombinace MYR a BIA zvýšilo aktivitu SULT1A1 v játrech a střední části tenkého střeva. Podání samotného myricetinu nemělo žádný výrazný efekt. Výrazný pokles v aktivitě enzymu byl zaznamenán v proximální části tenkého střeva. Všechny cytosolární vzorky kromě premedikace BIA + MYR vykazovaly nulovou aktivitu enzymu. Podezření na degradaci vzorků bylo následně potvrzeno elektroforézou na polyakrylamidovém gelu, kde byly po obarvení přítomny neobvyklé, odlišné proteinové zóny.

Následně byl studován vliv podaných flavonoidních látek na expresi enzymu SULT1A1 v játrech a střevech pomocí metody Western blot. Jaterní cytosolární vzorky byly nejprve podrobeny detekci protilátkou připravenou proti proteinu SULT1A1, která ale oproti deklarované specifitě detekovala i další isoformy SULT. Toto bylo pravděpodobně způsobeno vysokou sekvenční homologií a identitou, které jsou společné podrodině SULT1. Proto byla dále použita anti-peptidová protilátka proti SULT1A1, jejíž použití poskytlo již specifickou imunodetekci SULT1A1. V souladu s výsledky měření aktivity enzymu došlo v játrech k výraznější indukci SULT1A1 po premedikaci dihydromyricetinem a v menší míře i biochaninem A. Zatímco indukce potkaní SULT1A1 biochaninem A ve tkáni jater i střev byla již pozorována⁸⁵, indukční efekt dihydromyricetinu na enzymy druhé fáze biotransformace zatím nebyl v literatuře popsán. Vliv flavonoidních látek v jednotlivých částech střev není jednotný. V proximální části tenkého střeva nebyla imunodetekcí nalezena žádná proteinová zóna, což spolu s kontrolním polyakrylamidovým gelem potvrdilo to, že došlo k degradaci cytosolárních vzorků (obr. 21, str. 60). Důvodem mohlo být nedostatečné promytí střev před samotnou homogenací. Ve tkáni střední a distální části tenkého střeva byla exprese SULT1A1 detekována u všech cytosolárních vzorků včetně kontrolní premedikace. Enzym SULT1A1 se ve tkáni exprimoval nezávisle na premedikaci flavonoidními látkami. Oproti tomu v tlustém střevě nebyl protein SULT1A1 detekován vůbec. Obarvený kontrolní gel ukázal, že vzorek odpovídající premedikaci myricetinem vykazoval stejnou míru degradace jako cytosoly z proximální části tenkého střeva (viz obr. 21, str. 60). To také objasnilo výrazně nízkou aktivitu SULT1A1 po premedikaci myricetinem vzhledem ke kontrole. I přes použití anti-peptidové protilátky byl navíc v jaterní tkáni detekován neznámý protein o velikosti zhruba 36 kDa. Vybraná peptidická sekvence, proti které byla protilátka produkována plně odpovídá sekvenci SULT1A1. Část peptidické sekvence tedy pravděpodobně odpovídá sekvenci jiného proteinu, který se konstitutivně exprimuje v jaterní tkáni.

V poslední části této rigorózní práce byl zkoumán vliv flavonoidních látek myricetinu a dihydromyricetinu na aktivitu lidského rekombinantního enzymu SULT1A1. Jako referenční inhibitor byl použit flavonoid kvercetin, jehož nekompetitivní inhibiční účinky na SULT1A1 již byly popsány¹¹³. Tento flavonoid inhiboval aktivitu SULT1A1 a byla určena hodnota $IC_{50} = 10,7 \mu M$, která koreluje s již publikovanými výsledky¹¹⁵. Dihydromyricetin neinhiboval aktivitu SULT1A1. Myricetin také neinhiboval aktivitu

SULT1A1 i přesto, že některé studie jeho inhibiční účinky na SULT1A1 prokazují⁷³. Navzdory tomu, že hydroxylované sloučeniny bývají účinnými inhibitory enzymových reakcí se u dihydromyricetinu ani myricetinu tento předpoklad nepotvrdil.



Obr. 21: Srovnání elektroforetického rozdělení degradovaných a nepoškozených cytosolárních vzorků.

1 - degradovaný cytosolární vzorek tlustého střeva po premedikaci MYR, 2 - nepoškozený cytosolární vzorek tlustého střeva po premedikaci DHM, 3 - degradovaný cytosolární vzorek proximální části tenkého střeva po premedikaci DHM, 4 - nepoškozený cytosolární vzorek proximální části tenkého střeva po premedikaci MYR + BIA

Pro elektroforézu vzorků proximální části tenkého střeva (30 µg/jamka) a tlustého střeva (45 µg/jamka) byl použit 12 % polyakrylamidový gel.

BIA - biochanin A; MYR - myricetin, DHM - dihydromyricetin

Cílem této práce bylo charakterizovat a porovnat vliv flavonoidní látky dihydromyricetinu, která je komerčně dostupná jako doplněk stravy, na biotransformační enzym SULT1A1, který se podílí na metabolismu xenobiotik a metabolické aktivaci prokarcinogenů. Indukce enzymů, aktivujících látky na reaktivní intermediáty, může vést ke zvýšení rizika vzniku nádorového onemocnění. Dihydromyricetin indukoval SULT1A1 v jaterní tkáni potkanů a způsobil i jeho vyšší aktivitu. Ačkoliv většina studií poukazuje na pozitivní účinky flavonoidních látek, zejména prostřednictvím inhibice a potlačení procesu karcinogeneze, v tomto případě může být efekt opačný.

6. SOUHRN

Tato práce se soustředila na charakterizaci vlivu vybraných flavonoidních látek na expresi a aktivitu sulfotransferasy SULT1A1, která se mimo detoxikace také podílí na metabolické aktivaci chemických karcinogenů. Zvýšená aktivita a exprese tohoto enzymu tedy může potencovat karcinogenní procesy.

V rámci studia této problematiky bylo dosaženo následujících výsledků:

- Aktivita SULT1A1 v játrech potkanů byla zvýšena oproti kontrole ve všech případech premedikace flavonoidními látkami biochaninem A, myricetinem, dihydromyricetinem a současným podáním myricetinu + biochaninu A a dihydromyricetinu + biochaninu A. Dihydromyricetin a biochanin A indukovaly SULT1A1 v játrech potkanů.
- Podání biochaninu A zvýšilo aktivitu SULT1A1 ve tkáni distální části tenkého střeva a v tlustém střevě potkanů. Ve tkáni střední a distální části tenkého střeva se SULT1A1 exprimoval ve všech cytosolárních vzorcích včetně kontrolní premedikace ve stejné míře, nezávisle na premedikaci.
- Kvercetin inhiboval aktivitu lidského rekombinantního enzymu SULT1A1 a byla stanovena hodnota $IC_{50} = 10,7 \mu M$. Myricetin, dihydromyricetin ani biochanin A neinhibovaly aktivitu SULT1A1.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Luch, A.: *Nat. Rev. Cancer* 5, 113–125 (2005)
2. Williams, G.M.: *Toxicol.* 166, 3–10 (2001)
3. „<https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/roc/index-1.html>.“ (cit. 20.5.2017)
4. McKenna, R.J.: *Cancer* 61, 2365–2371 (1988)
5. Stratil, P., Kubáň, V.: *Chem. Listy* 98, 379–387 (2004)
6. „<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.“ (cit. 20.5.2017)
7. „http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_E.pdf.“ (cit. 20.5.2017)
8. Knejzlik, Z., Kas, J., Ruml, T.: *Chem. Listy* 94, 913–918 (2000)
9. Martínková, J.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, Grada Publishing, Havlíčkův Brod, Česká Republika (2007)
10. Stiborová, M.: *Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace*, Sborník z multioborového semináře "Otevřená věda" z 22.- 29. 10. 2005, Praha
11. Danielson, P.B.: *Curr. Drug Metab.* 3, 561–597 (2002)
12. Gelboin, V.: *Physiol. Rev.* 60, 1107–1154 (1980)
13. Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E: *Biomed. Pap.* 154, 103–116 (2010)
14. Kehoe, J.W., Bertozzi, C.R.: *Chem. Biol.* 7, 57–61 (2000)
15. Habuchi, O.: *Biochim. Biophys. Acta* 1474, 115–127 (2000)
16. Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R.G., Windmill, K.F., Martin, J.L., McManus, M.E.: *Toxicol Sci* 90, 5–22 (2006)
17. Surh, Y-J.: *Chem. Interact.* 109, 221–235 (1998)
18. Coughtrie, M.W.H.: *Chem.-Biol. Interact.* 259, 2–7 (2016)
19. Runge-Morris, M., Kocarek, T.A.: *Drug Metab. Rev.* 45, 450–459 (2013)
20. Blanchard, R.L., Freimuth, R.R., Buck, J., Weinshilboum, R., Coughtrie, M.W.H.: *Pharmacogenet. Genomics* 14, 199–211 (2003)

21. Falany, C.N., Xie, X., Wang, J., Ferrer, J., Falany, J.L.: *Biochem. J.* 864, 857–864 (2000)
22. Sakakibara, Y., Yanagisawa, K., Takami, Y., Nakayama, T., Suiko, M., Liu, M.-Ch.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 681–686 (1998)
23. Freimuth, R.R., Wiepert, M., Chute, C.G., Wieben, E.D., Weinshilboum, R.M.: *Pharmacogenomics J.* 4, 54–65 (2004)
24. Takahashi, S., Sakakibara, Y., Mishihiro, E., Kouriki, H., Nobe, R., Kurogi, K., Yasuda, S., Liu, M-Ch., Suiko, M.: *J. Biochem.* 146, 399–405 (2009)
25. Nagata, K., Ozawa, S., Miyata, M., Shimada, M., Gong, D.-W., Yamazoe, Y., Kato, R.: *J. Biol. Chem.* 268, 24720–24725 (1993)
26. Gong, D.-W., Ozawa, S., Yamazoe, Y., Kato, R.: *J. Biochem.* 110, 226–231 (1991)
27. Kohjitani, A., Fuda, H., Hanyu, O., Strott, C.A.: *Gene* 367, 66–73 (2006)
28. Riches, Z., Stanley, E.L., Bloomer, J.C., Coughtrie, M.W.H.: *Drug Metab. Dispos.* 37, 2255–2261 (2009)
29. Meinl, W., Sczesny, S., Brigelius-Flohe, R., Blaut, M., Glatt, H.: *Drug Metab. Dispos.* 37, 1179–1186 (2009)
30. Dunn, R. 2nd, T., Klaassen, C.D.: *Drug Metab. Dispos.* 26, 598–604 (1998)
31. Klaassen, C., Liu, L., Dunn, R. 2nd.: *Chem. Biol. Interact.* 109, 299–313 (1998)
32. Borthwick, E.B., Burchell, A., Coughtrie, M.W.H.: *Biochem. J.* 289, 719–725 (1993)
33. Driscoll, W.J., Komatsu, K., Strot, C.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 12328–12332 (1995)
34. Wang, L-Q., James, M.O.: *Curr. Drug Metab.* 7, 83–104 (2006)
35. Wang, T., Cook, I., Leyh, T.S.: *Biochemistry* 53, 6893–6900 (2014)
36. Marshall, A.D., McPhie, P., Jakoby, W.B.: *Arch. Biochem. Biophys.* 382, 95–104 (2000)
37. Glatt, H.: *Faseb* 11, 314–321 (1997)
38. King, C.M., Phillips, B.: *Science* 159, 1351–1353 (1968)
39. Ozawa, S., Chou, H.-Ch., Kadlubar, F.F., Nagata, K., Yamazoe, Y., Kato, R.: *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 1220–1228 (1994)

40. Glatt, H., Boeing, H., Engelke, Ch.E.H., Ma, L., Kuhlow, A., Pabel, U., Pomplun, D., Teubner, W., Meinl, W.: *Mutat. Res.* 482, 27–40 (2001)
41. Crofts, F.G., Sutter, T.R., Strickland, P.T.: *Carcinogenesis* 19, 1969–1973 (1998)
42. Buonarati, M.H., Turteltaub, K.W., Shen, N.H., Felton, J.S.: *Mutat. Res. Lett.* 245, 185–190 (1990)
43. Kaderlik, K.R., Minchin, R.F., Mulder, G.J., Ilet, K.F., Daugaard-Jenson, M., Teitel, Ch., Kadlubar, F.F.: *Carcinogenesis* 15, 1703–1709 (1994)
44. Rybicki, B.A., Neslund-Dudas, Ch., Bock, C.H., Nock, N.L., Rundle, A., Jankowski, M., Levin, A.M., Beebe-Dimmer, J.: *Cancer Prev. Res.* 4, 1636–1645 (2011)
45. Prescott, L.F.: *Br. J. Clin. Pharmacol.* 10, 291–298 (1980)
46. Kirk, C.J., Harris, R.M., Wood, D.M., Waring, R.H., Hughes, P.J.: *Biochem. Soc.* 29, 209–216 (2001)
47. Waring, R.H., Harris, R.M.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 244, 2–9 (2005)
48. Wang, J., Falany, J.L., Falany, C.N.: *Mol. Pharmacol.* 53, 274–282 (1998)
49. Miyazaki, W., Iwasaki, T., Takeshita, A., Kuroda, Y., Koibuchi, N.: *J. Biol. Chem.* 279, 18195–18202 (2004)
50. Lin, J.H., Lu, A.Y.H.: *Clin. Pharmacokinet.* 35, 361–390 (1998)
51. Runge-Morris, M., Kocarek, T.A., Falany, C.N.: *Drug Metab. Dispos.* 45, 15–33 (2013)
52. Maiti, S., Chen, G.: *Arch. Biochem. Biophys.* 418, 161–168 (2003)
53. Hempel, N., Barnett, A., Gamage, N., McManus, M.E., Negishi, M.: Human SULT1A1, in Human Cytosolic Sulfotransferases (Pacifci, G.M., Coughtrie, M.W.H.) CRC Press, USA, str. 181–232 (2005)
54. Hempel, N., Gamage, N., Martin, J.L., McManus, M.E.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 685–689 (2007)
55. Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W.: *J. Sci. Food Agric.* 80, 1081–1093 (2000)
56. Haslam, E.: Polyphenols - structure and biosynthesis, in Practical Polyphenols - From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action (Haslam, E.) Cambridge University Press, UK, str. 10–84 (1998)
57. Pietta, P.: *J. Nat. Prod.* 63, 1035–1042 (2000)

58. Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M.: *Chem. Interact.* 139, 1–21 (2002)
59. Cermak, R.: *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4, 17–35 (2008)
60. Hollman, P., Katan, M.: *Food Chem. Toxicol.* 37, 937–942 (1999)
61. Rice-Evans, C.: *Curr. Med. Chem.* 8, 797–807 (2001)
62. Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., De, B.: *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 3, 91–100 (2010)
63. Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C.: *Int. J. Biomed. Sci.* 4, 89–96 (2008)
64. Boušová, I., Skálová, L.: *Drug Metab. Rev.* 44, 267–286 (2012)
65. Walle, T., Otake, Y., Brubaker, J.A., Walle, U.K., Halushka, P.V.: *Br. J. Clin. Pharmacol.* 51, 143–146 (2001)
66. Chen, C., Kong, A.-N.T.: *Free Radical Biol. Med.* 36, 1505–1516 (2004)
67. Skibola, C., Smith, M.: *Free Radical Biol. Med.* 29, 375–383 (2000)
68. Galati, G., O'Brien, P.J.: *Free Radical Biol. Med.* 37, 287–303 (2004)
69. Moon, Y.J., Wang, X., Morris, M.E.: *Toxicol. Vitro.* 20, 187–210 (2006)
70. Tsyrllov, I.B., Mikhailenko, V.M., Gelboin, H.V.: *Biochim. Biophys. Acta* 1205, 325–335 (1994)
71. Obach, R.S.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 88–95 (2000)
72. van Zanden, J.J., ben Hamman, O., van Iersel, M.L., Boeren, S., Cnubben, N.H., Lo Bello, M., Vervoort, J., van Bladeren, P.J., Rietjens, I.M.: *Chem. Interact.* 145, 139–148 (2003)
73. Eaton, E.A., Walle, U.K., Lewis, A.J., Hudson, T., Wilson, A.A., Walle, T.: *Drug Metab. Dispos.* 24, 232–237 (1996)
74. Otake, Y., Nolan, A. L., Walle, U. K., Walle, T.: *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 73, 265–270 (2000)
75. Kukongviriyapan, V., Phromsopha, N., Tassaneeyakul, W., Kukongviriyapan, U., Sripa, B., Hahnvajjanawong, V., Bhudhisawasdi, V.: *Xenobiotica* 36, 15–28 (2006)
76. Harris, R.M., Wood, D.M., Bottomley, L., Blagg, S., Owen, K., Hughes, P.J., Waring, R.H., Kirk, C.J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 1779–1787 (2004)
77. Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Yeh, G.C.D.: *Biochem. J.* 340, 715–722 (1999)

78. Sugatani, J., Yamakawa, K., Tonda, E., Nishitani, S., Yoshinari, K., Degawa, M., Abe, I., Noguchi, H., Miwa, M.: *Biochem. Pharmacol.* 67, 2991–2992 (2004)
79. Bock, K.W., Eckle, T., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S.: *Biochem. Pharmacol.* 59, 467–470 (2000)
80. Zhai, S., Dai, R., Friedman, F.K., Vestal, R.E.: *Drug Metab. Dispos.* 26, 989–992 (1998)
81. Williams, J.A., Ring, B.J., Cantrell, V.E., Campanale, K., Jones, D.R., Hall, S. D., Wrighton, S.A.: *Drug Metab. Dispos.* 30, 1266–1273 (2002)
82. Ghazali, R.A., Waring, R.H.: *Life Sci.* 65, 1625–1632 (1999)
83. Chan, H.Y., Leung, L.K.: *Br. J. Nutr.* 90, 457–465 (2003)
84. Kao, Y., Zhou, C., Sherman, M., Laughton, C.A., Chen, S.: *Environ. Health Perspect.* 106, 85–92 (1998)
85. Chen, Y., Huang, C., Zhou, T., Zhang, S., Chen, G.: *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24, 102–114 (2010)
86. Helsby, N. A., Chipman, J. K., Gescher, A., Kerr, D.: *Food Chem. Toxicol.* 36, 375–382 (1998)
87. Chen, Y., Huang, C., Zhou, T., Chen, G.: *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 553–559 (2008)
88. von Moltke, L.L., Weemhoff, J.L., Bedir, E., Khan, I.A., Harmatz, J.S., Goldman, P., Greenblatt, D.: *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1039–1044 (2004)
89. Miniscalco, A., Lundahl, J., Regardh, C.G., Edgar, B., Eriksson, U.G.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 1195–1199 (1992)
90. Walle, U.K., Walle, T.: *Drug Metab. Dispos.* 30, 564–569 (2002)
91. Zhou, T., Chen, Y., Chen, G.: *J. Appl. Toxicol.* 32, 804–809 (2011)
92. Hyun, T.K., Eom, S.H., Yu, C.Y., Roitsch, T.: *Planta Med.* 76, 943–949 (2010)
93. Shen, Y., Lindemeyer, A.K., Gonzalez, C., Shao, X.M., Spigelman, I., Olsen, R.W., Liang, J.: *J. Neurosci.* 32, 390–401 (2012)
94. Kim, M.H., Chung, Y.T., Lee, J.H., Park, Y.S., Shin, M.K., Kim, H.S., Kim, D.H., Lee, H.Y.: *Korean J. Med. Crop. Sci.* 8, 225–233 (2000)
95. Chen, S.H., Zhong, G.S., Li, A.L., Li, S.H., Wu, L.K.: *China J. Chin. Med.* 31, 1094–1096 (2006)

96. Davies, D.L., Bortolato, M., Finn, D.A., Ramaker, M.J., Barak, S., Ron, D., Liang, J., Olsen, R.W.: *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 37, 8–15 (2013)
97. Hou, X., Zhang, J., Ahmad, H., Zhang, H., Xu, Z., Wang, T.: *PLoS One* 9, 1–10 (2014)
98. Wang, Z., Sun, X., Feng, Y., Liu, X., Zhou, L., Sui, H., Ji, Q., E, Q., Chen, J., Wu, L., Li, Q.: *Anticancer. Drugs* 28, 281–288 (2017)
99. Kou, X., Shen, K., An, Y., Qi, S., Dai, W.-X., Yin, Z.: *Phyther. Res.* 26, 988–994 (2012)
100. „<http://www.smarternootropics.com/2013/08/dihydromyricetin-an-end-to-alcohol-woes/>“ (cit. 20.5.2017)
101. Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R.: *J. Agric. Food Chem.* 54, 7692–7702 (2006)
102. Flamini, R., Mattivi, F., De Rosso, M., Arapitsas, P., Bavaresco, L.: *Int. J. Mol. Sci.* 14, 19651–19669 (2013)
103. Maggiolini, M., Recchia, A. G., Bonofiglio, D., Catalano, S., Vivacqua, A., Carpino, A., Rago, V., Rossi, R., Andò, S.: *J. Mol. Endocrinol.* 35, 269–281 (2005)
104. Santell, R.C., Chang, Y.C., Nair, M.G., Helferich, W.G.: *J. Nutr.* 127, 263–269 (1997)
105. Srinivas, N.R.: *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 40, 119–125 (2015)
106. Moon, Y.J., Morris, M.E.: *Mol. Pharm.* 4, 865–872 (2007)
107. Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., van de Putte, B.: *J. Agric. Food Chem.* 41, 1242–1246 (1993)
108. Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J.F., Flamm, G.W., Williams, G.M., Lines, T.C.: *Food Chem. Toxicol.* 45, 2179–2205 (2007)
109. Wang, L., Tu, Y.-Ch., Lian, T.-W., Hung, J.-T., Yen, H.-H, Wu, M.-J.: *J. Agric. Food Chem.* 54, 9798–9804 (2006)
110. Wiechelman, K.J., Braun, R.D., Fitzpatrik, J.D.: *Anal. Biochem.* 175, 231–237 (1988)
111. Frame, L.T., Ozawa, S., Nowell, S.A., Chou, H-Ch., Delongchamp, R.R., Doerge, D.R., Lang, N.P., Kadlubar, F.F.: *Drug Metab. Dispos.* 28, 1063–1068 (2000)
112. Mulder, G.J., Hinson, J.A., Gillette, J.R.: *Biochem. Pharmacol.* 26, 189–196 (1977)

113. De Santi, C., Pietrabissa, A., Mosca, F., Rane, A., Pacifici, G. M.: *Xenobiotica* 32, 363–368 (2002)
114. Miyano, J., Yamamoto, S., Hanioka, N., Narimatsu, S., Ishikawa, T., Ogura, K., Watabe, T., Nishimura, M., Ueda, N., Naito, S.: *Biochem. Pharmacol.* 69, 941–950 (2005)
115. James, M.O., Ambadapadi, S.: *Drug Metab. Rev.* 45, 401-414 (2013)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno, příjmení, adresa	Číslo OP	Datum	Poznámka